



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Química e Ingeniería Química

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

Evaluación de la capacidad de formación de biofilms de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* sobre acero inoxidable mediante microscopía de epifluorescencia directa

TESIS

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

AUTOR

Brayan Roger Héctor CERVANTES HUAMÁN

ASESOR

Miriam Estela MEMENZA ZEGARRA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cervantes, B. (2017). Evaluación de la capacidad de formación de biofilms de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* sobre acero inoxidable mediante microscopía de epifluorescencia directa. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

1413
M73


UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA ✓
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria - Av. Venezuela s/n - Lima 1

"AÑO DEL BUEN SERVICIO AL CIUDADANO"

110

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL ✓

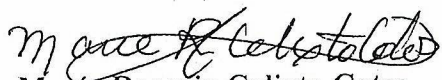
A C T A DE TITULACION POR TESIS


Los suscritos Miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, bajo la Presidencia de la Mg. **MARÍA ROSARIO CALIXTO COTOS** (Presidenta), el Q.F. **OSCAR PEDRO SANTISTEBAN ROJAS** (Miembro) y la Mg. **MIRIAM ESTELA MEMENZA ZEGARRA** (Asesora), habiendo presentado para el efecto la **TESIS**, titulada **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILMS DE DIFERENTES CEPAS DE *Listeria monocytogenes* SOBRE ACERO INOXIDABLE MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA DIRECTA** ✓, después de **SUSTENTADA Y APROBADA LA TESIS** elaborada por el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial: **BRAYAN ROGER HÉCTOR CERVANTES HUAMÁN** ✓, para optar el **TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL** ✓, acordando calificarla con la **NOTA** de:

DIECISIETE
(LETRAS)


17
(NÚMEROS)

Lima, 17 de noviembre del 2017 ✓


Mg. María Rosario Calixto Cotos
Presidenta


Q.F. Oscar Pedro Santisteban Rojas
Miembro


Mg. Miriam Estela Memenza Zegarra
Asesora


Ph.D. Jorge Ernesto Guevara Vasquez
Director de la EP de Ingeniería Agroindustrial

DEDICATORIA

A mis padres, Héctor y Cristina, y hermanas, Keyla y Paola, por su apoyo constante durante toda mi vida universitaria, y por su comprensión las veces que buscaba vivir experiencias únicas muy lejos de casa.

A mi abuela, Sabina Huamaní, por ser una de las personas más alegres en cada objetivo alcanzado, por sus sabios consejos que siempre los tendré presente y por su infinito amor.

AGRADECIMIENTOS

A Carolina Ripollès Avila, por ser la persona que me acompañó durante todo este proceso, desde el inicio de los ensayos experimentales hasta la redacción de la presente tesis. Por su infinita paciencia, por su manera de explicar, por su gran disponibilidad de ayudarme, por su confianza hacia mi persona, por permitirme ser parte de su trabajo, por sus consejos y por todas las risas y anécdotas vividas en el laboratorio que siempre las recordaré con mucho cariño y nostalgia.

A Alfons y Anne-Sophie, por acogerme de la mejor manera dentro del grupo de trabajo, por ayudarme cada vez que tenía dudas, por sus consejos y por su gran compañerismo, estoy seguro que fui muy afortunado de conocerlos.

Al Dr. José Juan Rodríguez Jerez, por ser la persona quien me dio la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en el laboratorio y por confiar en mí aún cuando no me conocía. La verdad es que si no te hubiera conocido nada de esto sería una realidad, pero la vida me dio esa gratitud de llegar hacia tu persona, mil gracias Pepe.

A los demás compañeros del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona, especialmente a ti Dolors, por tu buen sentido del humor que hacía más ameno la rutina de trabajo en el laboratorio.

A mi asesora, Mg. Miriam Estela Memenza Zegarra, por brindarme su apoyo incondicional y consejos para la finalización de la presente tesis, aún cuando la distancia era una dificultad usted siguió acompañándome en esta aventura.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

"AÑO DEL BUEN SERVICIO AL CIUDADANO"

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

A C T A DE TITULACION POR TESIS

Los suscritos Miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, bajo la Presidencia de la **Mg. MARÍA ROSARIO CALIXTO COTOS** (Presidenta), el **Q.F. OSCAR PEDRO SANTISTEBAN ROJAS** (Miembro) y la **Mg. MIRIAM ESTELA MEMENZA ZEGARRA** (Asesora), habiendo presentado para el efecto la **TESIS**, titulada **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILMS DE DIFERENTES CEPAS DE *Listeria monocytogenes* SOBRE ACERO INOXIDABLE MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA DIRECTA**", después de **SUSTENTADA Y APROBADA LA TESIS** elaborada por el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial: **BRAYAN ROGER HÉCTOR CERVANTES HUAMÁN**; para optar el **TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**, acordando calificarla con la **NOTA** de:

DIECISIETE

(LETRAS)

17

(NÚMEROS)

Lima, 17 de noviembre del 2017

Mg. María Rosario Calixto Cotos
Presidenta

Q.F. Oscar Pedro Santisteban Rojas
Miembro

Mg. Miriam Estela Memenza Zegarra
Asesora

Ph.D. Jorge Ernesto Guevara Vasquez
Director de la EP de Ingeniería Agroindustrial



CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	5
2.1. Biofilm	5
2.1.1. Definición	5
2.1.2. Características	6
2.1.3. Estructura	9
2.1.3.1. Modelos estructurales	9
2.1.3.1.1. Modelo de monocapa.....	9
2.1.3.1.2. Modelo estructural tridimensional o multicapa	9
2.1.3.1.3. Modelo de champiñón o tulipán	10
2.1.4. Proceso de formación.....	12
2.1.4.1. Adhesión inicial reversible	12
2.1.4.2. Adhesión irreversible	13
2.1.4.3. Formación de microcolonias	14
2.1.4.4. Maduración	14
2.1.4.5. Dispersión	15
2.1.5. Factores que intervienen en su formación	17
2.1.6. Comunicación bacteriana dentro del biofilm (Quorum sensing).....	18
2.1.7. Presencia de biofilm en las instalaciones de procesado de alimentos	19
2.1.8. Detección y cuantificación de biofilm	20
2.1.8.1. Microscopía de fluorescencia	23
2.1.8.1.1. Microscopio de fluorescencia de luz transmitida	23
2.1.8.1.2. Microscopio de epifluorescencia directa	23
2.1.8.1.3. Principio de fluorescencia	25
2.1.8.1.4. Evaluación de la viabilidad de los microorganismos	26

2.1.8.2. Análisis de imagen.....	28
2.1.9. Control	29
2.1.10. Bacterias formadoras de biofilm.....	32
2.1.10.1. Patógenos implicados.....	32
2.1.11. Relación entre la formación de biofilm y la persistencia.....	33
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	35
2.2.1. Generalidades y características	35
2.2.2. Formación de biofilm por <i>L. monocytogenes</i>	38
2.2.3. Estructura del biofilm formado por <i>L. monocytogenes</i>	39
2.2.4. Serotipos	40
2.2.5. Listeriosis	41
2.2.6. Persistencia en las instalaciones de la industria alimentaria	43
3. PARTE EXPERIMENTAL	45
3.1. Lugar de ejecución del estudio	45
3.2. Preparación de las superficies de ensayo	45
3.3. Reactivación de las cepas de <i>L. monocytogenes</i>	46
3.4. Preparación del inóculo.....	47
3.5. Formación de los biofilms.....	48
3.6. Evaluación.....	48
3.6.1. Recuento de las células del biofilm por sistema TEMPO®	48
3.6.2. Recuento de las células del biofilm por recuento en placa	50
3.6.3. Recuento de las células del biofilm por microscopía de epifluorescencia directa (DEM)	50
3.7. Análisis estadístico.....	52
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1. Evaluación de la formación de biofilm por las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> mediante sistema TEMPO®	54

4.2. Evaluación de la formación de biofilm por las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> mediante recuento en placa	55
4.3. Evaluación de los biofilms producidos por las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> mediante microscopía de epifluorescencia directa.....	55
4.4. Comparación de los métodos empleados para la cuantificación de las células presentes en los biofilms	69
5. CONCLUSIONES	76
6. RECOMENDACIONES.....	77
7. BIBLIOGRAFÍA	78
8. ANEXOS	103

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>L. monocytogenes</i> empleadas en el estudio	47
Tabla 2. Recuento de las células presentes en los biofilms evaluados por los tres métodos	54
Tabla 3. Comparación de la capacidad de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> para formar biofilm sobre polietileno (previo estudio) y acero inoxidable (presente estudio)	60
Tabla 4. Porcentaje de viabilidad de las células que forman el biofilm en las cepas estudiadas..	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Matriz de sustancias poliméricas extracelulares a diferentes dimensiones. (a) Modelo de un biofilm adherido a una superficie. (b) Componentes mayoritarios del biofilm: polisacáridos, proteínas y ADN. (c) Interacciones fisicoquímicas débiles y enlaces fuertes que otorgan estabilidad a la matriz.	6
Figura 2. Modelo estructural actual de champiñón o tulipán.....	11
Figura 3. Representación esquemática del proceso de formación del biofilm. (1) Adhesión inicial, (2) adhesión irreversible, (3) desarrollo de microcolonias por proliferación, (4) maduración del biofilm, y (5) dispersión.	16
Figura 4. Proceso de formación del biofilm, con previo acondicionamiento de la superficie.....	16
Figura 5. Trayectoria de la luz a través de un microscopio de fluorescencia de luz transmitida (A) y un microscopio de epifluorescencia directa (B).	24
Figura 6. Recuento por microscopía de epifluorescencia directa, expresado en $\log UFC/cm^2$	57
Figura 7. Recuentos obtenidos por microscopía de epifluorescencia directa de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> ordenadas descendentemente en función de su capacidad de formación de biofilms.	58
Figura 8. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia directa de cepas de <i>L. monocytogenes</i> a 20X post tinción con LIVE/DEAD [®] , incubados a 30°C durante 7 días, a) CECT 5672, b) 4423, c) S2-1, d) S2BAC, e) S2-2, f) S10-1.....	64
Figura 9. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia directa de cepas de <i>L. monocytogenes</i> a 20X post tinción con LIVE/DEAD [®] , incubados a 30°C durante 7 días, g) EDG-e, h) CECT 935, i) R6, j) CECT 5873, k) CECT 5366, l) CDL69	65

Figura 10. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia directa de cepas de <i>L. monocytogenes</i> a 20X post tinción con LIVE/DEAD [®] , incubados a 30°C durante 7 días, m) S1(S), n) S1(R), o) P12, p) A7, q) CECT 911.	66
Figura 11. Comparación entre los recuentos obtenidos por microscopía de epifluorescencia directa (DEM) y por sistema TEMPO [®] para los biofilms formados por <i>L. monocytogenes</i> CECT 5672, CECT 5873 y CECT 911.	74
Figura 12. Comparación entre los recuentos obtenidos por sistema TEMPO [®] y recuento en placa para los biofilms formados por <i>L. monocytogenes</i> CECT 5672, CECT 5873 y CECT 911.....	75

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Composición de medios preparados	103
ANEXO B. Costos por servicio de análisis de superficies alimentarias mediante diferentes métodos.....	104
ANEXO C. Ventajas y desventajas de los métodos empleados.	104
ANEXO D. Microscopio de epifluorescencia directa (DEM)	105
ANEXO E. Estación de TEMPO [®] filler	105
ANEXO F. Estación de TEMPO [®] prep	106
ANEXO G. Estación de TEMPO [®] reader.....	106
ANEXO H. Ejemplo de muestra de resultados por el sistema TEMPO [®]	107
ANEXO I. UFC de <i>Listeria monocytogenes</i> en medio agar TSA	107
ANEXO J. Resultado positivo para <i>Listeria</i> en medio selectivo cromogénico ALOA.....	108
ANEXO K. Inoculación de <i>L. monocytogenes</i> en suspensión sobre discos de acero inoxidable para el inicio de la formación de biofilm.....	108
ANEXO L. Metodología aplicada para la formación y cuantificación de los biofilms.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

AFNOR: Asociación Francesa de Normalización

AI: Autoinductores

ANOVA: Análisis de la Variancia

ATP: Adenosín trifosfato

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CLSM: Microscopía confocal de barrido por láser

DEM: Microscopía de epifluorescencia directa

EDTA: Etilendiaminotetraacético

EFSA: European Food Safety Authority (Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria)

ETA: Enfermedad de Transmisión Alimentaria

INIA: Instituto Nacional de Investigación y tecnología Agraria y Alimentaria

log: Logaritmo en base 10

LPS: lipopolisacáridos

NMP: Técnica del Número Más Probable

p: Valor p

PI: Yoduro de propidio

QS: Quorum sensing

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SPE: Sustancias poliméricas extracelulares

sTSYEB: Caldo de triptona soja y extracto de levadura (TSYEB, *Tryptone Soy Yeast Extract Broth*), suplementado con cloruro de sodio y glucosa.

TSA: Tryptic Soy Agar (Agar de soja triptona)

TSB: Tryptic Soy Broth (Caldo de soja triptona)

TSS: Tryptone Saline Solution (Solución salina de triptona)

UFC: Unidades formadoras de colonias

VBNC: Viable pero no cultivable

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de evaluar la capacidad de formación de biofilm por diecisiete cepas de *L. monocytogenes* sobre una superficie de acero inoxidable a una temperatura de 30°C, alta humedad y en un periodo de siete días, mediante el uso de tres métodos de recuento como el sistema TEMPO[®], recuento en placa y microscopía de epifluorescencia directa, además de comparar su eficacia en determinar el número de células presentes en el biofilm.

La cepa con un mayor número de células presentes en el biofilm fue *L. monocytogenes* CECT 5672 con un recuento de 2.17×10^7 UFC/cm², evaluado por microscopía de epifluorescencia directa. Sin embargo, la evaluación por sistema TEMPO[®] y recuento en placa determinaron que la mayor productora de biofilm fue la cepa *L. monocytogenes* 4423 con recuentos de 4.70×10^6 y 3.98×10^6 UFC/cm², respectivamente. Los tres métodos coincidieron en que la cepa con una menor producción de biofilm fue *L. monocytogenes* CECT 911, obteniéndose recuentos de 5.98×10^5 , 5.59×10^5 y 2.98×10^6 UFC/cm² por sistema TEMPO[®], recuento en placa y por microscopía de epifluorescencia directa, respectivamente. Los recuentos de las cepas de mayor producción de biofilm, mencionadas anteriormente, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$), en su mayoría, con los recuentos obtenidos por las otras cepas estudiadas. Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre la mayor y menor cepa productora de biofilm, en los tres métodos evaluados.

Se determinó que no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los recuentos obtenidos por sistema TEMPO[®] y por recuento en placa. Sin embargo, se encontraron diferencias

significativas entre los recuentos obtenidos por estos dos métodos con los obtenidos por microscopía de epifluorescencia directa para todas las cepas, excepto *L. monocytogenes* R6 en la que su recuento por microscopía de epifluorescencia directa no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) con el recuento en placa. No se encontró una relación directamente proporcional entre la producción de biofilm y el porcentaje de células viables. El modelo de regresión lineal fue el más idóneo para relacionar los tres métodos.

Finalmente, se concluye que todas las cepas estudiadas presentan diferentes capacidades para formar biofilm, y que el método que presenta las mayores ventajas en cuanto a su sensibilidad y rapidez para cuantificar células del biofilm fue la microscopía de epifluorescencia directa.

1. INTRODUCCIÓN

Tanto la calidad como el estado sanitario de los productos alimenticios son aspectos que los consumidores reflexionan y analizan en el momento de realizar la compra. Las industrias procesadoras de alimentos tienen la gran responsabilidad de ofrecer productos en un estado tal que no ponga en riesgo la salud pública, garantizando la seguridad de sus procesos y por ende la de sus productos.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son el efecto de la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos patógenos, o también por agentes químicos, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Pueden llegar a originar brotes, asociados principalmente a prácticas higiénicas inadecuadas del personal manipulador, contaminaciones cruzadas, en especial contaminación microbiana desde las superficies de contacto y de equipos al alimento que se está procesando, las materias primas, transmisión por vectores y otras causas ambientales. Dentro de estas posibles causas, aquella que representa una de las vías de contaminación microbiana más frecuente en la industria de los alimentos y ambientes domésticos es la relacionada con las superficies de contacto con alimentos (Kusumaningrum et al., 2003; Garret et al., 2008).

Basta que las bacterias encuentren las condiciones nutricionales y ambientales adecuadas para que puedan multiplicarse exponencialmente y colonizar las superficies, si además, no se tiene un adecuado programa de higienización, las bacterias se agruparán y formarán biofilms. Éstos son poblaciones de microorganismos asociados a la superficie, rodeados por una matriz compuesta

por sustancias poliméricas extracelulares producidas por ellos mismos, y que se compone principalmente de polisacáridos.

Una de las bacterias patógenas asociadas a ETAs más importantes debido a su letalidad y altas tasas de mortalidad, es la llamada *Listeria monocytogenes* (Sofos y Geornaras, 2010). A esta bacteria se le adjudica la capacidad de crecer en diferentes superficies (acero inoxidable, vidrio, polietileno, teflón, etc.) directamente relacionadas con el ambiente de producción alimentario, así como también se le asocia al hecho de permanecer en las mismas por largos periodos de tiempo bajo la forma de biofilms (Borucki et al., 2003). La formación de biofilms ofrece una clara ventaja en cuanto a la protección de *L. monocytogenes* frente a una gran variedad de condiciones de estrés, tales como temperaturas extremas, rayos ultravioletas, biocidas y desecación (Carpentier y Cerf, 2011). En los biofilms, *L. monocytogenes* también muestra una mayor resistencia a los detergentes y desinfectantes, lo que dificulta la descontaminación y erradicación completa (Pan et al., 2006). Sin embargo, esta capacidad de formar biofilms es diferente en cada cepa, y también dependerá de la temperatura, los nutrientes presentes y del tipo de superficie al cual se adhieran (Min et al., 2006; Bonsaglia et al., 2014; Gião y Keevil, 2014).

El control y la prevención de la presencia de este microorganismo es todo un desafío para las industrias del sector, debido no solo a que es capaz de formar biofilms, sino que también tiene la capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración, tolerar altas concentraciones de sal y medios ácidos (Gandhi y Chikindas, 2007). Si no se toman las medidas de higienización adecuadas en las superficies de trabajo, este patógeno contaminará el alimento y provocará una enfermedad denominada listeriosis, que causa un espectro de enfermedades que van desde gastroenteritis febril a enfermedades invasivas tales como bacteriemia, sepsis, meningitis y meningoencefalitis,

principalmente en pacientes con factores de riesgo como por ejemplo personas inmunocomprometidas, o individuos de alto riesgo como ancianos, niños y mujeres embarazadas (Vásquez-Boland et al., 2001; Mammina et al., 2009). Los alimentos más susceptibles a ser contaminados por este patógeno son las carnes, vegetales, productos lácteos, alimentos listos para el consumo (RTE, *Ready to eat*) y en general los conservados en refrigeración por largos periodos de tiempo (Pesavento et al., 2010).

El estudio de la presencia de este microorganismo en alimentos y, especialmente en entornos industriales como las superficies, evaluando la capacidad para formar biofilms, detectarlos e intentar eliminarlos, constituye uno de los ejes fundamentales para garantizar la seguridad alimentaria del futuro.

Los resultados de esta investigación favorecerán en el conocimiento sobre la capacidad de formación de biofilm de las diecisiete cepas de *L. monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable (uno de los materiales más empleados en la industria agroalimentaria). La información obtenida será de utilidad para las empresas del sector alimentario, debido a que muestra las condiciones ambientales a la que se forma un biofilm, las mismas que deberán evitarse con un buen programa de limpieza y desinfección. Además, se muestra una técnica fiable (microscopía de epifluorescencia directa) que permite cuantificar la contaminación microbiológica de las superficies de trabajo, así como también detectar las formaciones de biofilms que se estén desarrollando en las mismas, obteniendo resultados en tiempos cortos que permitan al empresario poder tomar decisiones en a tiempo

Los objetivos del presente estudio se muestran a continuación:

Objetivo general

Evaluar la capacidad de formación de biofilms de diecisiete cepas de *L. monocytogenes* sobre acero inoxidable.

Objetivos específicos

- Formar biofilms de cepas de *L. monocytogenes* sobre acero inoxidable.
- Determinar y comparar el recuento de células presentes en un biofilm mediante sistema TEMPO[®], recuento en placa y microscopía de epifluorescencia directa (DEM).
- Comparar la capacidad de formación de biofilms de todas las cepas de *L. monocytogenes* empleadas en el estudio.
- Determinar el método más eficaz en la cuantificación del número de células que forman el biofilm.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Biofilm

2.1.1. Definición

En los ecosistemas naturales y manufacturados, las células bacterianas pueden existir bajo dos estados, planctónico y sésil. Planctónico, es decir las células son de libre flotación y están suspendidas en el fluido. Sésil, las células crecen en colonias y se adhieren a una superficie sólida, estas células son las formadoras de biofilm (Abdallah et al., 2014). Factores ambientales como el pH, la actividad del agua, la temperatura y la composición nutritiva del suelo alimentario pueden ser importantes para la transición fenotípica de las células planctónicas a la forma sésil (Shi y Zhu, 2009).

Se ha reportado que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilms, y tan solo el 1% vive en estado planctónico (Sanclement et al., 2005; Ramadan, 2006), razón suficiente para seguir desarrollando e investigando esta forma predominante de las bacterias.

Donlan (2002) estableció la definición más ampliamente aceptada para un biofilm, como una comunidad microbiana (de una o múltiples especies) sésil, conformada por células viables y no viables que están adheridas irreversiblemente a un sustrato (biótico o abiótico) o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que ellas han producido, y que exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica.

2.1.2. Características

El biofilm está compuesto por un 10 – 25% de células y un 75 – 90% de SPE (Watnick y Kolter, 2000). Dicha SPE está constituida fundamentalmente por exopolisacáridos, los que son producidos por los propios microorganismos presentes en el biofilm, y en menor cantidad contienen proteínas, fosfolípidos, ácidos teicoicos e incluso ácidos nucleicos, los que son adquiridos a partir de la lisis bacteriana (Figura 1) (Watnick y Kolter, 2000; Djordjevic et al., 2002).

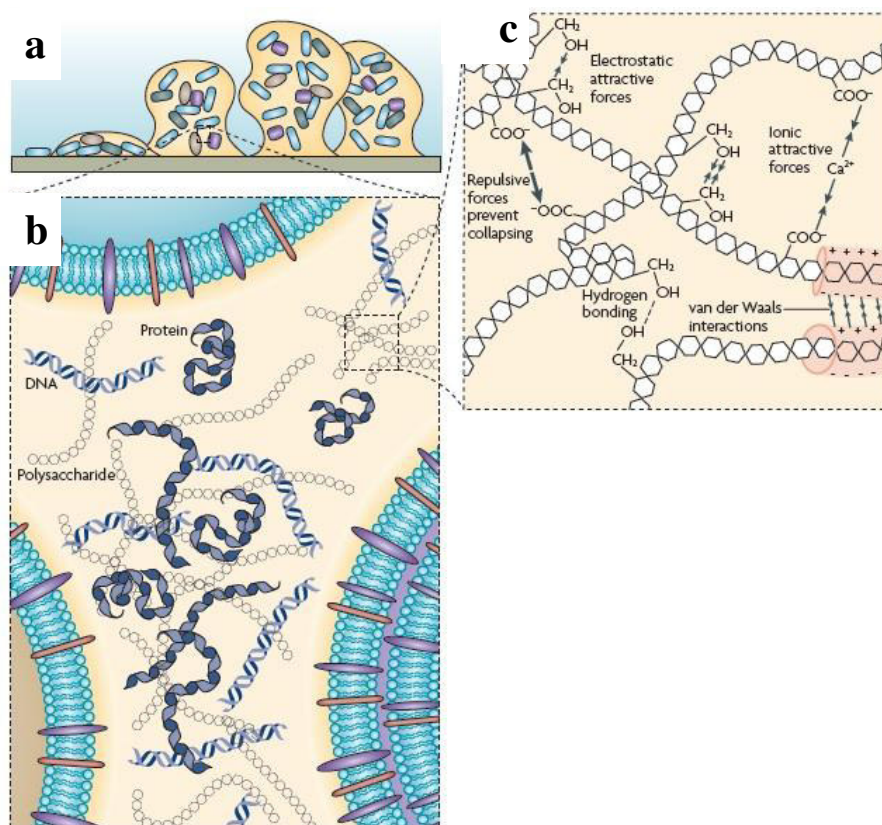


Figura 1. Matriz de sustancias poliméricas extracelulares a diferentes dimensiones. (a) Modelo de un biofilm adherido a una superficie. (b) Componentes mayoritarios del biofilm: polisacáridos, proteínas y ADN. (c) Interacciones fisicoquímicas débiles y enlaces fuertes que otorgan estabilidad a la matriz (Flemming y Wingender, 2010).

La matriz es muy hidratada, debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de su estructura, llegando a representar hasta el 97% de la matriz (Donlan, 2002). Proporcionan la estabilidad mecánica de los biofilms, median su adhesión a las superficies y forman una red polimérica tridimensional cohesiva que interconecta e inmoviliza transitoriamente las células del biofilm (Post et al., 2004). Debido a la retención de enzimas extracelulares, se genera un sistema digestivo externo versátil, secuestrando nutrientes disueltos de la fase acuosa y permitiéndoles ser utilizados como fuentes de nutrientes y energía. La matriz también actúa como centro de reciclaje manteniendo todos los componentes de células lisadas disponibles. Esto incluye ADN, que puede representar un reservorio de genes para la transferencia horizontal de genes. La SPE también puede servir como una fuente de nutrientes, aunque algunos componentes de la SPE son lentamente biodegradables y, debido a su complejidad, la degradación completa de todos sus componentes requiere una amplia gama de enzimas. La matriz, en general, protege a los microorganismos contra la desecación, los biocidas oxidantes o cargados, algunos antibióticos y cationes metálicos, la radiación ultravioleta y las defensas inmunitarias del huésped. Ecológicamente, la competencia y la cooperación en el espacio confinado de la matriz conducen a una adaptación constante de la aptitud de la población (Flemming y Wingender, 2010).

Los exopolisacáridos pueden estar asociados con iones metálicos y cationes bivalentes, por lo tanto, la matriz puede tener carga neutra o carga polianiónica, lo que les permitiría interactuar con distintos antimicrobianos, de forma tal que estos pueden quedar atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias. La producción de exopolisacáridos se ve influida por la calidad nutricional presente en el medio. Se ha observado que un incremento en la concentración de nutrientes está correlacionado con un aumento en el número de células bacterianas adheridas. Disponer de un exceso de carbono y/o limitación de nitrógeno, potasio o fosfato promueve la

síntesis de exopolisacáridos (Sutherland, 2001; Donlan, 2002; Post et al., 2004; Flemming y Wingender, 2010).

Una vez que los biofilms se forman sobre una superficie de contacto, las células presentes en el biofilm pueden ser de 500 a 1500 más resistentes a los agentes antimicrobianos y desinfectantes que las células planctónicas (Hyde et al., 1998), debido a la SPE producida por ellas mismas (Carpentier y Cerf, 2011; Lourenço et al., 2011; Martins y Germano, 2011), además de ser más resistentes a las altas temperaturas y al bajo pH que las células planctónicas o libres (Castro-Rosas y Escartínb, 2005). Esta resistencia permitirá la persistencia del biofilm en superficies y equipos de contacto con los alimentos, constituyendo de esta forma una fuente continua de contaminación (Abdallah et al., 2014). Por otra parte, varios informes ya han demostrado la capacidad de las especies de bacterias para producir biofilms sobre los materiales comúnmente utilizados en la industria alimentaria, como el acero inoxidable, vidrio, caucho y poliestireno (Simões et al., 2010). Las células bacterianas en biofilms se consideran difíciles o incluso imposibles de erradicar. Además, la formación de biofilms en las instalaciones de la industria alimentaria puede desencadenar pérdidas económicas, debido al consecuente deterioro de los alimentos y del equipo (Bremer et al., 2006).

Debido a todo ello, resulta esencial establecer procedimientos adecuados de limpieza y desinfección, con el fin de evitar la formación de biofilms sobre las superficies de trabajo y la contaminación de los productos alimenticios, causada por la propagación de los microorganismos que habitan en los biofilms, y que por la dinámica de los mismos llegan a desprenderse (Chavant et al., 2002).

2.1.3. Estructura

La arquitectura de los biofilms está influenciada por diversos factores, incluyendo condiciones hidrodinámicas, concentración de nutrientes, motilidad bacteriana y comunicación intercelular, así como la presencia de exopolisacáridos y proteínas (Flemming y Wingender, 2010).

La estructura que presentan los biofilms ha sido también motivo de diversas investigaciones. Mediante el empleo de la microscopía se han propuesto distintos modelos que explican la forma que adoptan estas estructuras, así como la disposición de sus componentes dentro del biofilm (Agle, 2007; Kokare et al, 2008).

2.1.3.1. Modelos estructurales

2.1.3.1.1. Modelo de monocapa

Fue la primera teoría que intentaba describir la estructura del biofilm. Es un modelo continuo, que describe los biofilms como lisos, planos y homogéneos (Bishop, 1997; Chmielewski y Frank, 2003). Además, explica la actividad química de los biofilms basados en la difusión, los efectos físicos del flujo, la presión y el flujo de desprendimiento en sistemas de distribución de agua (Bishop, 1997; Wimpenny et al., 2000).

2.1.3.1.2. Modelo estructural tridimensional o multicapa

El empleo del microscopio de contraste diferencial fue la base para el diseño de este modelo, el cual describe al biofilm como un mosaico heterogéneo con microorganismos aglomerados, sostenidos por la SPE (Bishop, 1997). Este modelo está definido en conceptos biológicos

simples: las células metabolizan sustratos, excretan, mantienen el nivel de energía, se dividen o mueren dependiendo de la disponibilidad de los nutrientes. Cuando la célula se divide, empuja a las demás hacia un lado. Cuando la célula muere, los componentes celulares son reciclados para ser usados como nutrientes. Para este modelo se asume que las células del biofilm tienen una alta afinidad entre ellas, causando que se fijen entre sí y permite explicar la incorporación de diversas comunidades microbianas con características propias (Wimpenny et al., 2000).

2.1.3.1.3. Modelo de champiñón o tulipán

Este modelo representa la teoría actual que se tiene acerca de la estructura del biofilm. Se basa en la evidencia provista por la microscopía de barrido confocal que permitió la visualización del biofilm como una estructura de champiñón o tulipán con torres, pedestales y canales de agua. La estructura superior del biofilm tiene forma de tallo delgado, atravesado por canales de agua. Las torres contienen estelas, las cuales pueden romperse y liberar células que colonizan nuevas superficies (Figura 2) (Chmielewski y Frank, 2003).

Las torres están compuestos por microcolonias de diferentes células bacterianas, tanto aeróbicas como anaeróbicas, englobadas por exopolisacáridos, y separadas unas de otras por espacios intersticiales huecos, llamados canales de agua, que permiten el flujo de líquido y actúan como un sistema circulatorio primitivo para el transporte y difusión de nutrientes y oxígeno a las bacterias ubicadas en su interior, incluso aquellas situadas en las zonas más profundas del biofilm. Asimismo, constituyen un mecanismo para la remoción de productos de desecho metabólico (De Beer et al., 1994; Donlan, 2002). La existencia de estos canales de agua no impide, sin embargo, que dentro del biofilm se encuentren ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Por lo que se genera, de esta manera, una

gradiente de tensión de pH y de oxígeno, siendo metabólicamente más activas las áreas superficiales respecto a las más profundas. En estas últimas, las bacterias deben adaptarse a una disponibilidad reducida de oxígeno (De Beer et al., 1994; Sanderson et al., 2006).

Además, este modelo propone un crecimiento rápido de la célula en la periferia del biofilm, y un crecimiento lento en el interior. Los microorganismos en el interior del biofilm pueden competir, operar independientemente, cooperar o ser depredadores. Los nutrientes quedan atrapados y se concentran en la matriz del biofilm, transportándose a través de ella mediante difusión (Chmielewski y Frank, 2003). Por último, este modelo ha demostrado que el rango de la porosidad de los biofilms maduros en la parte superior es de 89% y de 5% en la capa inferior (Zhang y Bishop, 1994).

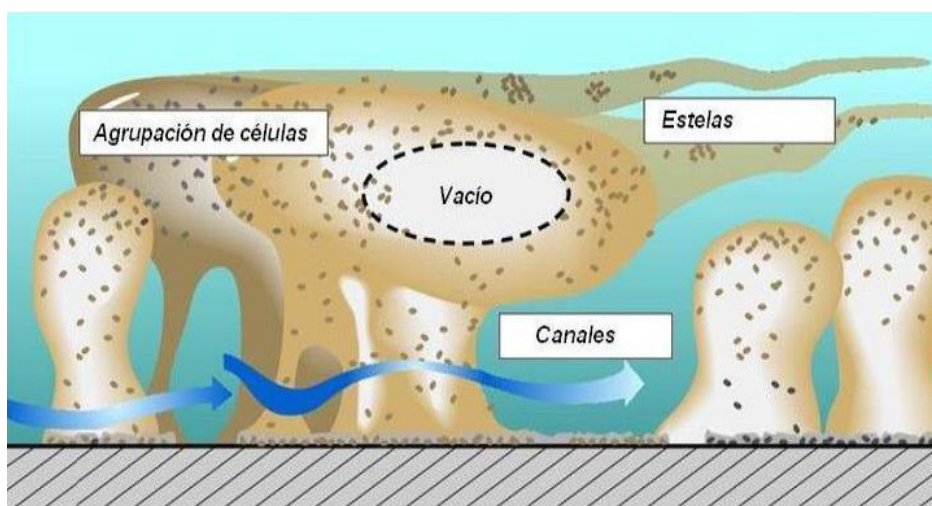


Figura 2. Modelo estructural actual de champiñón o tulipán (Stewart y Franklin, 2008)

2.1.4. Proceso de formación

La formación del biofilm resulta de un proceso continuo, que comienza con la adhesión bacteriana a una superficie hasta el desarrollo de una estructura compleja, y el desprendimiento de la misma, tal como se muestra en la Figura 3.

El proceso de formación del biofilm puede dividirse en 5 etapas:

2.1.4.1. Adhesión inicial reversible

El primer paso para la formación del biofilm es la adhesión reversible de la bacteria a la superficie, la cual se da en un tiempo muy corto, que por ejemplo para algunas cepas de *L. monocytogenes* podría ocurrir dentro de 3 a 5 segundos (Takhistov y George, 2004). En esta etapa la bacteria y el sustrato experimentan interacciones débiles como las hidrofóbicas, las de Van der Waals y fuerzas electrostáticas (Figura 1, c). Esta primera fijación puede ser activa o pasiva; activa, porque el transporte de las células libres (forma planctónica) hacia la superficie depende de la motilidad bacteriana otorgada por los flagelos, fimbrias y pili tipo IV; pasiva, porque su transporte depende de factores externos como la gravedad, difusión o por la turbulencia del fluido circundante. Se dice que esta primera etapa es reversible porque los microorganismos adheridos (forma sésil) pueden separarse de la superficie y volver a sus formas planctónicas en cualquier momento (Stoodley et al., 2002a, b).

El pre acondicionamiento de las superficies (Figura 4) es un factor que ha sido objeto de diversos estudios, al determinarse que contribuye positivamente en la adhesión inicial, ya que induce a la modificación de las características de la superficie, al adsorber iones cargados y moléculas orgánicas, promoviendo de esta forma la adhesión de las bacterias. Pero este proceso

previo dependerá del tipo de superficie, por ejemplo, los ácidos grasos se adhieren mejor a superficies hidrofóbicas y las moléculas orgánicas se adhieren mejor en superficies con alta energía libre como el acero inoxidable (Barnes y et al., 1999; Agle, 2007). Sin embargo, el estudio realizado por Berrón (2016) determinó que el pre acondicionamiento no influyó significativamente en la cantidad de biofilm formado por *L. monocytogenes*, por lo que este paso previo no es una regla general, sino que está influenciado por el tipo de microorganismo presente.

2.1.4.2. Adhesión irreversible

El cambio de la unión reversible a irreversible se produce como consecuencia del cambio de una interacción débil a una unión permanente de la bacteria con la superficie, otorgada por enlaces más fuertes (Figura 1, c), con la presencia de SPE producidas por los mismos microorganismos (Stoodley et al., 2002a, b).

La fijación de la bacteria a la superficie está influenciada por las propiedades fisicoquímicas de la superficie, como la carga, la rugosidad, la hidrofobicidad (superficie no polar como el teflón y otros plásticos) e hidrofiliidad (vidrio y acero inoxidable), además de las propiedades de la superficie celular y la velocidad del líquido (biofilms de flujo estático/dinámico) (Kumar y Anand, 1998; Donlan, 2002). Se ha determinado que los genes responsables de la adhesión, producción de SPE y de la síntesis de las proteínas de adhesión de la célula son activados en respuesta al estímulo ambiental (estrés y falta de nutrientes) y del quorum sensing (Chmielewski y Frank, 2003).

Generalmente las superficies con mayor energía libre e hidrofílicas, como el acero inoxidable y el vidrio, permiten una mejor adhesión bacteriana (Bos et al., 2000). La carga que presenta la superficie de las bacterias es negativa, lo que hace que se muestren como partículas hidrofóbicas; sin embargo, su hidrofobicidad decrecerá cuando lo haga su tasa de crecimiento, por lo que se incrementará la adhesión a superficies hidrofílicas cuando la bacteria se encuentran en su mayor actividad metabólica. Estudios diversos muestran que esa carga negativa de la superficie de la bacteria es proporcionada en parte por los lipopolisacáridos presentes en su membrana, por lo que si una bacteria es deficiente de este componente en su membrana reducirá su grado de hidrofobicidad, y por lo tanto su capacidad para adherirse a superficies hidrofílicas se verá afectada (Daved y O'Toole, 2000).

2.1.4.3. Formación de microcolonias

Simultáneamente con la producción de SPE, la acumulación y el crecimiento de los microorganismos adheridos conduce a la formación de microcolonias, donde el enlace entre las bacterias y el substrato se fortaleció y la colonia se estabilizó (Donlan, 2002). Dicha acumulación estimula el reclutamiento de células planctónicas del medio circundante como resultado de la comunicación célula a célula (quorum sensing) (Chmielewski y Frank, 2003).

2.1.4.4. Maduración

La maduración del biofilm está referida al desarrollo de un ecosistema altamente organizado y de una estructura tridimensional (estructuras 3D), que puede ser plana o en forma de hongo (Chmielewski y Frank, 2003). Durante la maduración, los biofilms desarrollan una estructura rígida debido a la producción celular de SPE (Bogino et al., 2013). Esta etapa requiere periodos

de 10 días o más (Stoodley et al., 2002a, b), donde diferentes procesos tienen lugar (es decir, la alteración de los genes que codifican las proteínas implicadas en la traducción, metabolismo, transporte de membrana y/o secreción y la regulación de genes). La maduración del biofilm se alcanza cuando estas estructuras son atravesadas por canales de agua o poros, que aseguran el intercambio de nutrientes y metabolitos, además de la eliminación de desechos bacterianos. La acumulación neta de biomasa en un biofilm maduro depende del crecimiento y del desprendimiento celular (Bryers, 2000).

2.1.4.5. Dispersión

La última etapa en el ciclo de formación del biofilm es la dispersión, donde las células sésiles pueden volver a sus formas planctónicas. Las causas potenciales de la disgregación de los biofilms son diferentes: (a) perturbación externa, tal como el aumento de la cizalladura del fluido; (b) procesos internos de biofilm, tales como degradación enzimática endógena; (c) liberación de SPE o proteína de unión a la superficie; (d) el hambre y la necesidad de buscar nuevos ambientes ricos en nutrientes (Stoodley et al., 2002a, b; Kaplan et al., 2003). Al margen del origen de la causa, el desprendimiento puede definirse como un proceso activo que permite la colonización de nuevos nichos por parte de las células liberadas. Las células pueden liberarse de forma individual o en bloques, en ésta última forma se cree que las células que la integran siguen aún preservando sus características que presentaban cuando eran parte del biofilm (Figura 4) (Post et al., 2004).

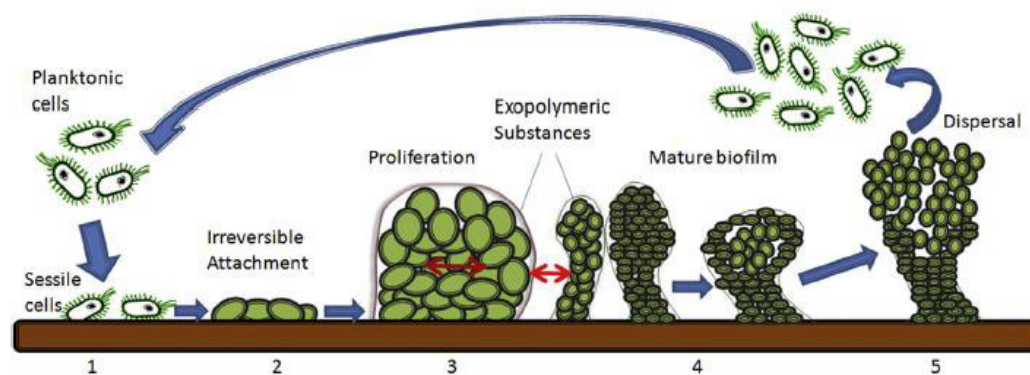


Figura 3. Representación esquemática del proceso de formación del biofilm. (1) Adhesión inicial, (2) adhesión irreversible, (3) desarrollo de microcolonias por proliferación, (4) maduración del biofilm, y (5) dispersión.

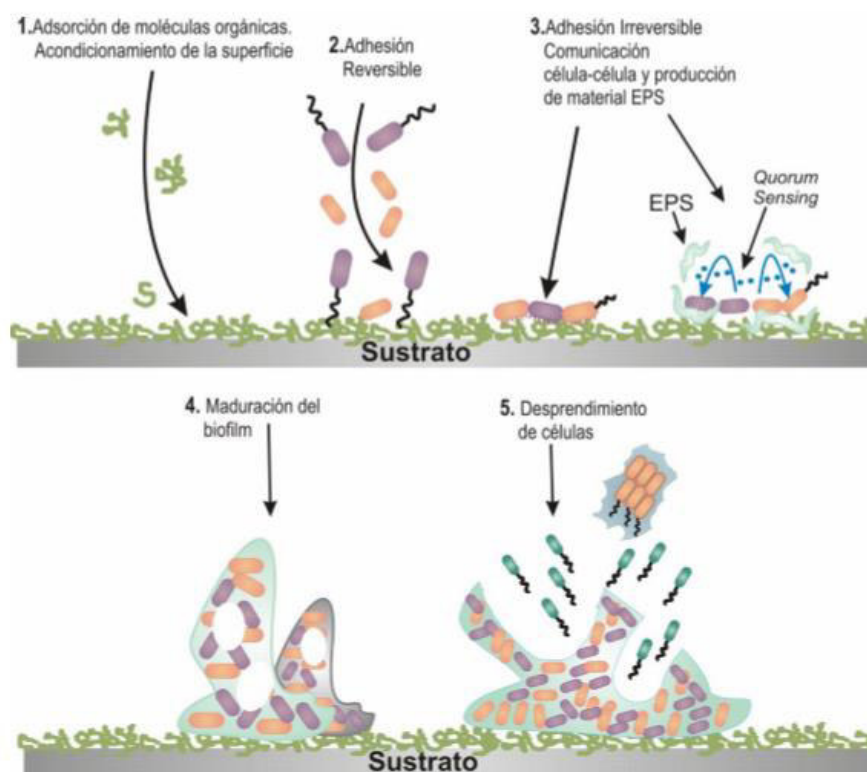


Figura 4. Proceso de formación del biofilm, con previo acondicionamiento de la superficie.

2.1.5. Factores que intervienen en su formación

Como se ha ido mencionando anteriormente, el desarrollo del biofilm al ser un proceso complejo es afectado por varios factores, tales como las condiciones ambientales (pH, concentración de NaCl, disponibilidad de nutrientes, temperatura, proteínas del huésped/adhesinas y la dinámica de fluidos), las características físicas de las superficies (energía libre, química, topografía y fisicoquímica), que juegan un papel importante en la fijación inicial de las células, y los factores microbiológicos (Gram negativo/positivo, forma microbiana, estructura, composición molecular, fisicoquímica, fase de crecimiento, edad, presencia de flagelos, pili, cápsulas o sustancias exopoliméricas) (Folsom et al., 2006; Valderrama y Cutter, 2013).

La alta energía libre y las superficies húmedas promueven la adhesión bacteriana, teniendo así que las superficies hidrófilas (acero inoxidable, vidrio, etc.) favorecen la adhesión celular en comparación a las superficies hidrófobas (caucho de nitrilo y otros plásticos). El acondicionamiento de la superficie también juega un papel clave en la velocidad de fijación bacteriana, las superficies podrían estar cubiertas por una película de moléculas orgánicas tales como proteínas o sustancias poliméricas producidas por bacterias. Finalmente, las propiedades fisicoquímicas de las superficies celulares son un aspecto importante en la adhesión bacteriana activa, las superficies de la mayoría de las células bacterianas están cargadas negativamente y esto mantiene a las células a una corta distancia de la superficie debido a una fuerza repulsiva electrostática. La superficie celular es capaz de reducir esta fuerza repulsiva gracias a su hidrofobicidad, que se debe a la presencia de fimbrias, flagelos y lipopolisacáridos (LPS). Se tiene referencias que las fimbrias ayudan fuertemente en el apego, superando la barrera de la

repulsión electrostática inicial, aunque muchas proteínas superficiales también han sido señaladas como partícipes en la unión inicial (Latasa et al., 2005).

Los efectos que causan todas las variables mencionadas sobre la adhesión bacteriana y la posterior formación del biofilm no son únicos, ya que pueden diferir entre las cepas y serotipos, además de la presencia de otras bacterias. Es importante mencionar que en la industria alimentaria el desarrollo del biofilm está influido también por la frecuencia de los regímenes de saneamiento (Cappitelli et al., 2014). Whitehead y Verran (2015) realizaron un informe más detallado sobre los factores que afectan la formación y la arquitectura del biofilm microbiano en la industria alimentaria.

2.1.6. Comunicación bacteriana dentro del biofilm (Quorum sensing)

La unión de los microorganismos a una superficie y la posterior formación de un biofilm necesitan que las bacterias se cercioren que han efectuado contacto. Para lograrlo requieren de señales químicas coordinadas que les permitan comunicarse entre ellas. El desarrollo de interacciones célula a célula se facilita por la estrecha proximidad existente entre las bacterias presentes en el biofilm. Esta interrelación, vía mensajeros de pequeñas moléculas, denominada quorum sensing (QS), beneficia a la bacteria al permitirle sentir la presencia de microorganismos vecinos, determinar la densidad de la población existente y responder a eventuales condiciones cambiantes. El proceso QS funciona debido a que cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señal que pone aviso de su presencia, de manera tal que mientras más bacterias se unen, se incrementa la concentración local de esta señal. Una vez logrado esto, se inducen diferentes fenómenos en la bacteria, para finalmente desencadenar la diferenciación del biofilm. Su objetivo es coordinar determinados comportamientos o acciones entre

microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número (Donlan, 2002; Post et al., 2004; Sancelment et al., 2005).

QS o autoinducción es un mecanismo de comunicación intercelular bacteriana, mediante el cual las bacterias coordinan los comportamientos individuales y grupales, incluyendo la maduración del biofilm y la posterior dispersión (Muller et al., 2007). La QS depende de la acumulación, liberación y detección sincronizada de moléculas de señal extracelular, llamadas autoinductores (AIs), por grupos de bacterias existentes a altas densidades celulares. Mediante la regulación de la expresión génica, los AIs conducen diversos procesos, incluyendo el desarrollo del biofilm, la acumulación de factores de virulencia, la producción de antibióticos y la bioluminiscencia (Verma y Miyashiro, 2013).

2.1.7. Presencia de biofilm en las instalaciones de procesamiento de alimentos

El primer informe publicado sobre biofilm bacteriano transmitido por los alimentos está relacionado con la adhesión de *Salmonella* a las superficies en contacto con los alimentos, pero también se documentó la persistencia de otros patógenos en las instalaciones alimentarias como *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7, entre otros (Waak et al., 2002; Aarnisalo et al., 2007).

El problema de la presencia de biofilms ha abarcado un amplio espectro de las industrias alimentarias, este problema se ve incrementado cuando las operaciones de limpieza y desinfección son inadecuadas, haciendo a los microorganismos más resistentes para ser eliminados (Shi y Zhu, 2009; Srey et al., 2013). Los programas de higienización que presenten limitaciones en sus procedimientos, generan una acumulación de microorganismos sobre las

superficies de los equipos, lo que resulta en la formación de biofilms, provocando una contaminación post-procesado y reduciendo la vida útil de los alimentos elaborados (Mattila et al., 1990). Se ha observado que las principales fuentes que participan en la acumulación de biofilms son los suelos, las tuberías de aguas residuales, cintas transportadoras, superficies de acero inoxidable, materiales de caucho y sellos de teflón (Blackman y Frank, 1996).

Las superficies con defectos, grietas, poros o articulaciones son las más propensas a permanecer con suciedad, de manera que proporcionan a los microorganismos de un excelente medio de cultivo para la formación de biofilms. Otros aspectos de diseño de los equipos, las soldaduras o las esquinas también son importantes factores que pueden estimular la formación de biofilms (Taylor et. al., 1998).

A pesar de las mejoras en el diseño de la planta, el diseño del equipo y los procedimientos para la limpieza y desinfección, el fenómeno de los biofilms en la industria alimentaria es todavía poco comprendido y controlado (Liu et al., 2015).

2.1.8. Detección y cuantificación de biofilm

El grado en que las células se unen inicialmente a una superficie y la cantidad de biofilm producido se han estudiado mediante métodos directos e indirectos (Djordjevic et al., 2002). Los métodos indirectos que han sido empleados son la tinción con cristal violeta sobre una placa de microtitulación (Stepanović et al., 2000), ensayos de inmuno-absorción ligado a enzimas (Wakimoto et al., 2004), reacción en cadena de la polimerasa (Lau et al., 2004) y el análisis de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (An y Friedman, 2000), en el que la intensidad de la respuesta se correlaciona con la densidad de las células adheridas, sin olvidar al

método de recuento en placa (método tradicional) y los métodos químicos. En algunos métodos indirectos los biofilms se disgregan por procedimientos mecánicos tales como vórtex, sonicación y raspado, ello con el objetivo de poder contar las células que la conforman. Los métodos directos son las técnicas microscópicas como la microscopía de epifluorescencia directa (DEM), la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía confocal de barrido por láser (CLSM). Estas técnicas permiten la cuantificación directa del número de células y su ubicación dentro de los biofilms, el tamaño de las células y la morfología (Daims y Wagner, 2007), la viabilidad de las células (Tawakoli et al., 2013), la cantidad de la sustancia polimérica extracelular y su distribución, además de la reconstrucción tridimensional de los biofilms (Zang y Fang, 2001).

En el método de recuento en placa, el empleo de las fuerzas mecánicas como la agitación, sonicación y el raspado de superficies, son necesarias para poder desprender las células presentes en el biofilm y adheridas a la superficie. Posteriormente a este proceso, resulta necesario cultivar las células desprendidas empleando diferentes medios de cultivos. Sin embargo, la cuantificación de las células presentes en el biofilm es difícil de realizar, debido a que éstas se adhieren fuertemente a las superficies y la acción mecánica no logra desprender todas las células. Otro inconveniente, es que el recuento en placa solo mide el número de células vivas capaces de crecer en el agar elegido; además, la obtención de resultados es lenta, ya que no se obtiene hasta las 48 horas como mínimo. En el caso de resultados no satisfactorios, no es posible adoptar medidas correctoras inmediatas, por lo que desde este punto de vista, no son útiles para ejecutar un plan de vigilancia (Fuster i Valls, 2006). Se ha informado de que los ultrasonidos proporcionan una herramienta adecuada para el muestreo de superficies biológicamente contaminadas, es así que se ha demostrado que el uso de ultrasonidos desprende

aproximadamente 10 veces el número de células adheridas a la superficie en comparación con el frotis (Donlan y Costerton, 2002).

Los métodos químicos utilizados en la evaluación de la formación de biofilm son métodos indirectos basados en la utilización o producción de compuestos específicos, por ejemplo, carbono orgánico, oxígeno, polisacáridos, enzimas y proteínas, o sobre el contenido de adenosín trifosfato (ATP). El método ATP por bioluminiscencia detecta la energía celular, representando el número de células con actividad metabólica de una muestra, por lo que proporciona información del número de células vivas en el biofilm (Baker, 1992).

Las técnicas microscópicas como la microscopía de epifluorescencia directa (DEM), la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía confocal de barrido por láser (CLSM), son herramientas muy informativas en la investigación de biofilms y en estudios de higiene. La SEM se ha utilizado para identificar estructuras de biofilm, pero no proporciona datos cuantitativos para el análisis estadístico. Con esta técnica se realizaron las primeras investigaciones para la observación de biofilms, utilizando disolventes (alcohol, acetona y xileno) para deshidratar las muestras gradualmente antes del examen, ya que el agua de hidratación no es compatible con el vacío utilizado por el haz de electrones y produciría la consiguiente distorsión de la imagen de la muestra. El desarrollo la CLSM en la década de 1980, permitió examinar biofilms in situ, aunque a menor aumento, pero sin las limitaciones de uso del microscopio electrónico de barrido. De este modo, la limitación de la resolución fue compensada por la capacidad de obtener imágenes inalteradas de la matriz de los biofilms (Donlan y Costerton, 2002).

2.1.8.1. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es uno de los métodos directos más utilizados para la observación de biofilms. Este tipo de microscopía emplea un colorante fluorescente (fluorocromo) que permite detectar moléculas que fluorescen (componente fluorescente) al absorber luz de onda corta y remitir una luz de longitud de onda mayor (Ríos Castillo, 2013).

La principal ventaja de la microscopía de fluorescencia es la distribución espacial de las células en la muestra y la posibilidad de observar su viabilidad. Sin embargo, la imagen es bidimensional y observar los biofilms de forma tridimensional se consigue con el uso de la microscopía confocal (Maukonen et al., 2003).

Existen dos tipos de microscopios de fluorescencia, según su trayectoria óptica (Figura 5):

2.1.8.1.1. Microscopio de fluorescencia de luz transmitida

Estos microscopios presentan un haz de luz que atraviesa un lente condensador y lo concentra sobre la muestra para obtener una iluminación óptima de la misma (Takeuchi y Frank, 2001).

2.1.8.1.2. Microscopio de epifluorescencia directa

Estos microscopios presentan más ventajas que los microscopios de luz transmitida, al presentar una luz de alta intensidad y dos sistemas de filtros. El primer filtro concentra la luz, dejando pasar solo la longitud de onda que excita a las moléculas fluorescentes (fluorocromos) que se quiere visualizar, antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo. De esta forma, las estructuras fluorescentes de las células aparecen

luminosas sobre un fondo oscuro cuando son observadas por los oculares del microscopio. Así mismo, un sistema de análisis digital de imágenes en un sistema acoplado al microscopio de epifluorescencia es una herramienta eficiente que puede ser utilizado para evaluar de forma cualitativa y cuantitativamente la biomasa, dimensiones y parámetros morfológicos básicos de las bacterias y los biofilms (Takeuchi y Frank, 2001).

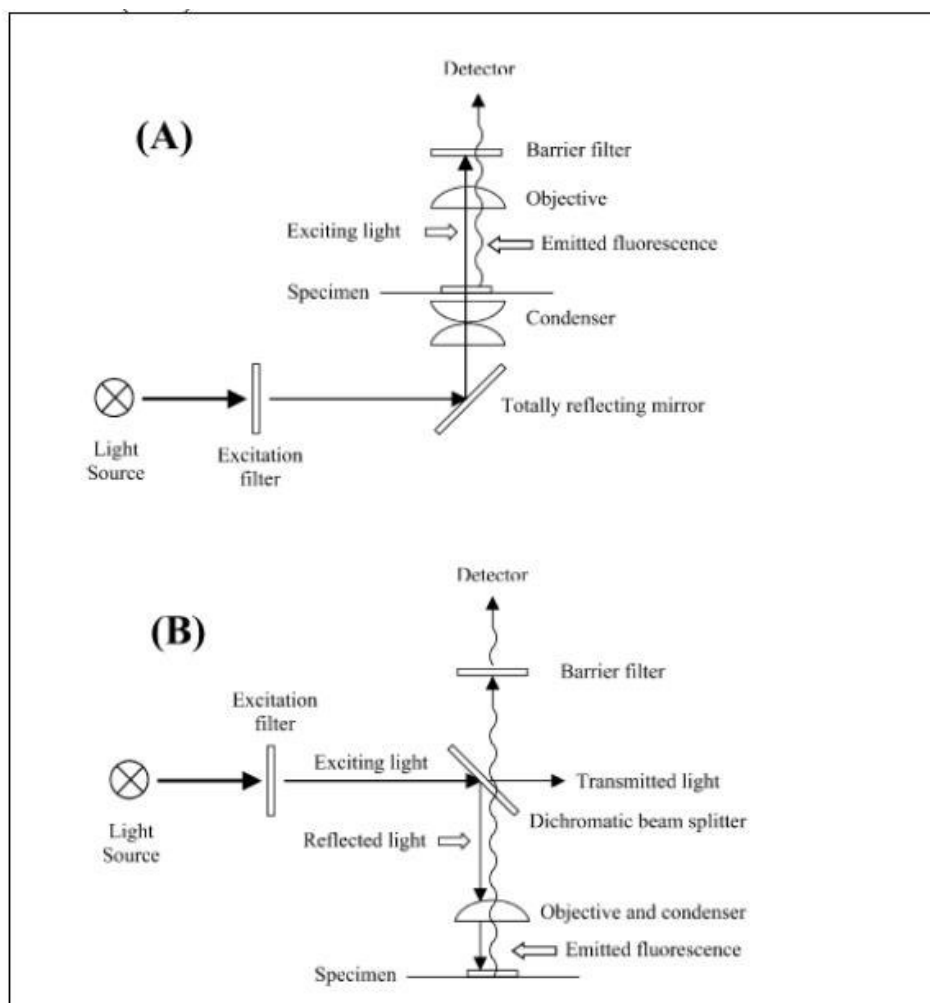


Figura 5. Trayectoria de la luz a través de un microscopio de fluorescencia de luz transmitida (A) y un microscopio de epifluorescencia directa (B). Modificado por Herman (1998).

Los componentes principales del microscopio de epifluorescencia se describen a continuación (Herman, 1998) (Figura 5).

- Primer filtro de corte o filtro de excitación: Es el filtro que selecciona la luz de la longitud de onda incidente.
- Espejo de ranuras ordenadas o espejo dicróico: Se trata de un espejo que tiene la propiedad de reflejar la luz de ciertas longitudes de onda y de dejar pasar otras.
- Segundo filtro de corte o filtro de emisión: Es el filtro que selecciona la luz de longitud de onda fluorescente.

Las posibles fuentes de luz corresponden a lámparas halogenadas de tungsteno, mercurio de alta presión, xenón, combinación de lámparas o láser de mercurio y xenón, capaces de emitir la energía de la excitación en diversas longitudes de onda. La excitación máxima de la fluorescencia ocurre cuando el pico de la longitud de onda de luz está cerca del límite de absorción de la molécula fluorescente (Herman, 1998).

Cabe mencionar que esta técnica es empleada actualmente como parte de un análisis para investigación o en caso de detectarse un problema específico que necesite su empleo, pero aún no se ha implementado como una técnica de rutina para el control del estado sanitario de superficies alimentarias, como sí lo es la técnica de Recuento en placa (método tradicional) o el Sistema TEMPO[®] en una menor proporción, debido a su mayor costo.

2.1.8.1.3. Principio de fluorescencia

La fluorescencia es una característica intrínseca de algunos átomos y moléculas que tienen la capacidad de absorber la luz de una determinada longitud de onda y emitirla a otra longitud de

onda más fuerte el punto larga. Cada átomo o molécula fluorescente puede absorber solamente ciertas longitudes de onda de la luz. Tras absorber un fotón de energía, el electrón de una molécula fluorescente se excita y pasa a un nivel de energía y vibración más alto (Herman, 1998).

El electrón cargado de energía cuando vuelve al estado energético normal se produce una pérdida de energía vibratoria en el ambiente produciéndose la emisión de un fotón de luz de una longitud de onda más alta. Si un componente de este tipo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizada a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la de la luz emitida, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro. Algunas moléculas son autofluorescentes y emiten fluorescencia cuando están excitadas. Este fenómeno se llama fluorescencia primaria (Takeuchi y Frank, 2001).

La fluorescencia secundaria representa la emisión producida después de que una molécula se combine con una molécula fluorescente primaria denominado fluorocromo. La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica de la molécula fluorescente utilizada (Takeuchi y Frank, 2001).

2.1.8.1.4. Evaluación de la viabilidad de los microorganismos

Resulta trascendental evaluar el estado vital de los microorganismos para aplicaciones como la detección y enumeración de bacterias alterantes de los alimentos, la evaluación de la eficacia de inactivación de un tratamiento, el control de cultivos estériles, la biodegradación, etc. Las células viables están definidas como aquellas capaces de desarrollar todas las funciones necesarias para sobrevivir bajo unas condiciones dadas (Breeuwer y Abee, 2000). Habitualmente

la capacidad que tienen las células en reproducirse es considerado como el signo de viabilidad por antonomasia y el método de recuento en placa es el más utilizado para evidenciarlo. No obstante, como ya se mencionó anteriormente este método es largo en cuanto a la obtención de resultados y además, los microorganismos muertos, con lesiones subletales, en estado viable pero no cultivables (VBNC), durmientes o inactivas, no son capaces de formar colonias y no se tienen en cuenta. Por otro lado, el recuento en placa de células viables tiene otras limitaciones, tal como la presencia de agregados bacterianos que se observan como una sola colonia, la presencia de sustancias inhibidoras producidas por flora competidora, así como la composición del medio de cultivo. Todos estos factores pueden producir un falso resultado que, en general, se traduce en una infraestimación del recuento microbiano (Breeuwer y Abee, 2000).

Para que un microorganismo viable pueda sobrevivir, los elementos esenciales y necesarios que han de presentar son: la membrana citoplasmática esté intacta, que se transcriba el DNA, y traducir del RNA, generar energía (ATP) para mantener el metabolismo, biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y otros componentes celulares; y, finalmente, crecer y multiplicarse (Fuster i Valls, 2006).

Las tinciones de viabilidad presentan ventajas interesantes como: sensibilidad, resolución inmediata, y posibilidad de analizar las células individualmente gracias a un programa de análisis de imagen. La combinación de estas técnicas con los grandes avances en el desarrollo de nuevas pruebas ópticas como el DEM y las enormes mejoras en las posibilidades técnicas de analizar el nivel de fluorescencia celular, facilitan comprender por qué la aplicación de pruebas fluorescentes han aumentado rápidamente en las dos últimas décadas (Breeuwer y Abee, 2000).

Tinciones fluorescentes para determinar la integridad de membrana

El azul de metileno y el rojo Congo son tinciones biológicas que se han venido empleando desde principios del siglo XX, con el objetivo de determinar la integridad de la membrana (Breuwer y Abee, 2000). El principio general de estas tinciones se basa en que las células con la membrana plasmática intacta no se tiñen. Sin embargo, las células con la membrana celular dañada permiten la entrada de los colorantes, y el resultado es que la célula queda teñida. El uso de tinciones de ácidos nucleicos como son el yoduro de propidio (PI), bromuro de etidio (EB), PO-PRO™-3 iodine, y SYTOX® Green son sustancias que permiten evaluar la viabilidad basándose en el mismo principio. Entre estas sustancias, el PI es la que más comúnmente se utiliza. Esta sustancia se comercializa en forma de kits, como por ejemplo el kit “Live/Dead® BacLight Bacterial Viability Kit” (Molecular Probes, Oregon, USA). El kit proporciona dos fluorocromos que se fijan al ácido nucleico de la célula: el SYTO® 9 y el PI. Las células con la membrana plasmática intacta son permeables al SYTO® 9 pero no al PI, por lo tanto, se teñirán de color verde. Las células que tienen la membrana plasmática dañada penetran los dos colorantes, así el PI reduce el SYTO® 9 y por lo tanto tiñe las bacterias de color rojo (Maukonen et al., 2000).

2.1.8.2. Análisis de imagen

Desde la década de 1970, los instrumentos comerciales de análisis de imágenes han estado disponibles para el recuento de colonias bacterianas. Sin embargo, también es posible analizar la estructura y actividad de estos agregados (colonias o biofilms), que son comunes en la naturaleza e importantes en la higiene de las industrias alimentarias (Wimpenny, Wilkinson y Peters, 1995).

El análisis de imagen es ahora un complemento bien establecido de la microscopía óptica, que permite la cuantificación rutinaria de las observaciones microscópicas (Colin y Gopal, 1996).

Recientemente, el análisis de imágenes se ha convertido en un accesorio invaluable para tal cuantificación porque reduce la subjetividad y permite la automatización. La disminución rápida de los costes informáticos ha hecho que el análisis de imágenes sea más práctico, y ahora es rutinario en varias aplicaciones de tecnología celular (Colin y Gopal, 1996).

Los sistemas de análisis de imágenes más baratos están incorporados a los ordenadores personales. Pueden capturar una imagen, típicamente de una cámara de vídeo montada en un microscopio, y pueden ser programadas para extraer o mejorar características de interés de los microorganismos (un proceso denominado procesamiento de imágenes). Las mediciones posteriores (análisis de imagen) se implementan en un software. Un mejor rendimiento a un costo más alto puede obtenerse mediante un hardware más sofisticado dedicado a las operaciones de procesamiento y análisis (Colin y Gopal, 1996).

2.1.9. Control

Controlar la formación de biofilm resulta todo un reto para la industria alimentaria, ya que no es una tarea fácil; sin embargo, limitar la disponibilidad de nutrientes y agua, además de controlar la temperatura y contar con un procedimiento de limpieza bien diseñado, resulta el primer paso para prevenir su formación (Chmielewski y Frank, 2003). Eliminar aquellos biofilms que se han adaptado al estrés ambiental generado por los métodos rutinarios de limpieza y desinfección resulta extremadamente desafiador. La estrategia de control más empleada aún sigue siendo el saneamiento mediante la limpieza con surfactantes y el uso de desinfectantes

químicos tales como compuestos de amonio cuaternario. Se tienen otras estrategias alternativas para controlar la formación de biofilm, los que incluyen el uso de quitosano, bacteriófagos, probióticos, ácidos orgánicos, extractos de plantas, bacteriocinas, lisozima, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y aceites esenciales tales como canela (Sandasi et al., 2010; Oliveira et al., 2012).

Se dispone de una amplia gama de antimicrobianos químicos para la industria alimentaria, entre los cuales los desinfectantes a base de cloro son los más utilizados, y presentan acción bactericida de amplio espectro (Yang et al., 2016). Para ser un desinfectante eficaz contra los biofilms, debe demostrarse una reducción de 3 unidades logarítmicas como mínimo (Somers y Wong, 2004). Norwood y Gilmour (2000) determinaron que para una reducción sustancial de *L. monocytogenes* en un biofilm de especies mixtas, se requiere una concentración de cloro 100 veces mayor que para un cultivo planctónico (1000 ppm y 10 ppm, respectivamente). El efecto que pueda tener cualquier desinfectante frente al biofilm será afectado, entre otros factores, por el tipo de superficie. Poimenidou et al. (2016) determinaron que el biofilm formado por diferentes cepas de *L. monocytogenes* sobre poliestireno fueron más tolerantes a desinfectantes como el ácido peracético y compuestos de amonio cuaternario, que los biofilms formados sobre acero inoxidable.

Se han realizado estudios sobre el efecto de los aceites esenciales en los biofilms bacterianos. Oliveira et al. (2010) informaron una reducción del 100% (5.64 log UFC/cm²) de biofilms listeriales sobre superficies de acero inoxidable usando una combinación de aceites esenciales de plantas de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon nardus*, y soluciones desinfectantes (etanol y solución salina con 0.5% (v/v) de Tween 80). Además, el tratamiento con aceite esencial de

canela dio como resultado una reducción de 2.54 log en el número de células listeriales sésiles sobre una superficie de acero inoxidable (Oliveira et al., 2012).

El quitosano se ha empleado raramente como desinfectante rutinario en la industria alimentaria, pero podría utilizarse como agente antimicrobiano en asociación con materiales poliméricos de envasado de alimentos (Fernández-Saiz et al., 2010; Friedman y Juneja, 2010). Tsai et al. (2002) informaron que el quitosano tiene actividad antimicrobiana en mariscos contra *A. hydrophila*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, etc, por lo que éste compuesto podría ser un prometedor agente natural en la erradicación de biofilms transportados por los mariscos. Se ha detectado que el biofilm formado por *L. monocytogenes* a bajas temperaturas es más resistente al quitosano que si se hubiese formado a una temperatura mayor (Puga et al., 2016). Sin embargo, Roller y Covill (1999) manifestaron que el principal obstáculo del quitosano para tal uso es la baja solubilidad en agua.

El control biológico mediante el uso de bacteriófagos se considera actualmente una técnica prometedora respecto a la eliminación de biofilms. Estos bacteriófagos son ampliamente reconocidos como predadores naturales de microorganismos y muy específicos, además de ser inofensivos para las células de mamíferos (Chibani-Chennoufi et al., 2004; Guenther et al., 2009). Por lo tanto, son diferentes enfoques antimicrobianos tradicionales utilizados ampliamente por la industria alimentaria, ya que estas últimas atacan indiscriminadamente a otras bacterias normales y beneficiosas (Sadekuzzaman, 2016). Varios estudios han reportado la efectividad de preparaciones de bacteriófagos tales como ListShield contra *L. monocytogenes* presentes en los alimentos (Hong et al., 2015). Soni y Nannapaneni (2010) informaron que el tratamiento con fagos redujo el número de células de biofilm de *L. monocytogenes* en 3.5 - 5.4

log UFC/cm² en superficies de acero inoxidable. Sin embargo, son muy pocos los estudios que han examinado la eficacia de las preparaciones de fagos frente a las biofilms presentes en los alimentos y las superficies de contacto con los mismos (Sadekuzzaman, 2016).

Por último, Høiby et al. (2010) sugirieron que el uso de enzimas, como la DNAsa y la aliasina de alginato, podrían ayudar a reducir los biofilms disolviendo su matriz de exopolisacáridos y aumentando así la susceptibilidad de los microorganismos inmersos en el biofilm a los antibióticos.

Si bien la mayoría de estos métodos alternativos muestran resultados interesantes respecto al control y la eliminación de biofilms, éstos enfoques tienen aún una eficacia limitada, son menos rentables y la mayoría de las técnicas son prácticamente inadecuadas para implementar en la industria alimentaria como controladores y erradicadores rutinarios de los biofilms formados (Sadekuzzaman, 2016).

2.1.10. Bacterias formadoras de biofilm

Cualquier tipo de microorganismos, incluyendo aquellos que causan deterioro y enfermedades, podrían formar un biofilm (Parsek y Singh, 2003).

2.1.10.1. Patógenos implicados

La formación de biofilms es, como ya se ha indicado, un problema de seguridad alimentaria, puesto que pueden alojar diferentes especies o cepas patógenas (Shi y Zhu, 2009; Srey et al., 2013). Los primeros que describieron la adhesión de una bacteria de transmisión alimentaria a una superficie en contacto con alimentos fueron Duguid et al. (1966), referido al caso de

Salmonella. Hasta la actualidad, muchos investigadores han estudiado la capacidad de los patógenos para formar biofilms en las instalaciones de la industria alimentaria, entre ellos resaltan *L. monocytogenes* (Herald y Zottola, 1988), *Yersinia enterocolitica* (Herald y Zottola, 1988), *C. jejuni* (Kuusela et al., 1989) y *E. coli* O157:H7 (Dewanti y Wong, 1995), entre otros. Más adelante, se identificaron a *Bacillus cereus*, *Shigella* spp., *S. aureus* (Sharma y Anand, 2002), *Vibrio* spp. (Bagge-Ravn, 2003) y *C. sakazakii* (Iversen et al., 2004) como habitantes de biofilms. Por lo general, los biofilms no están compuestos por una única bacteria sino por varias, interaccionando tanto biológica como espacialmente en función de las especificidades de cada una de las subpoblaciones presentes (Hernández Puga, 2016).

2.1.11. Relación entre la formación de biofilm y la persistencia

El concepto de persistencia, que implica el muestreo recurrente, se ha utilizado para describir el hecho de que algunas cepas se encuentran repetidamente durante largos períodos de tiempo (meses o años) en el mismo sitio, mientras que otras (transitorias) aparecen sólo ocasionalmente. La base de la persistencia en las plantas alimenticias permanece sin embargo esquivada y quizás haya más que un solo mecanismo que lo explica. La mayor tolerancia antimicrobiana ha sido descartada como causa principal (Lourenço et al., 2009). Buena capacidad para formar biofilms fue otra hipótesis (Moretro y Langsrud, 2004), pero no hay consenso a este respecto. Algunos autores han encontrado mayor adherencia a corto plazo en cepas persistentes (Norwood y Gilmour, 1999). Otros autores, sin embargo, han observado que tanto las cepas persistentes como las no persistentes han alcanzado densidades celulares similares al extender los tiempos de cultivo (Lunden et al., 2000).

Al analizar una posible relación entre la persistencia y la formación de biofilm, debe recordarse que las células del biofilm son heterogéneas. Pueden reaccionar de manera diferente al mismo tratamiento, ya que difieren en su posición y fisiología dentro de la estructura de la matriz (Costerton, 2007; Flemming y Wingender, 2010).

Algunos estudios sugirieron que las bacterias persistentes son genéticamente distintas de las transitorias (Wulff et al., 2006; Holch et al., 2013). Basándose en esta hipótesis, muchos estudios se centraron en buscar la presencia o ausencia de genes específicos para explicar la capacidad de persistir (Mazza et al., 2015). Los estudios han demostrado por tipificación molecular que todas las cepas persistentes pertenecían al mismo grupo genético (Wulff et al., 2006), correspondiente al complejo clonal CC121 (Holch et al., 2013).

Para otros autores, la persistencia bacteriana es un evento estocástico que no puede explicarse por características genéticas específicas (Carpentier y Cerf, 2011; Ferreira et al., 2014; Stasiewicz et al., 2015). Sobre la base de esta hipótesis, las bacterias persisten porque pueden adherirse a las superficies, estar protegidas en nichos de retención, crecer y adaptarse a las condiciones de estrés. A veces se explica que las bacterias son persistentes porque son más sésiles que las bacterias no persistentes (Norwood y Gilmour, 1999; Borucki et al., 2003; Wang et al., 2015), pero esta diferencia es discutida (Djordjevic et al., 2002). Otros resultados sugieren que las cepas pueden persistir porque son más resistentes a los productos químicos utilizados (Aase et al., 2000). Sin embargo, la diferencia en la sensibilidad a los desinfectantes entre bacterias persistentes y transitorias no siempre se demuestra (Lourenço et al., 2009; Wang et al., 2015; Magalhães et al., 2016).

2.2. *Listeria monocytogenes*

2.2.1. Generalidades y características

Esta bacteria pertenece al género *Listeria*, la cual engloba un total de ocho especies reconocidas (Velge y Roche, 2010; Bakker et al., 2010), siendo las especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* y *L. ivanovii* (Vásquez-Boland et al., 2001) conocidas anteriormente, y las dos últimas: *L. rocourtiae* (Leclercq et al., 2010) y *L. marthii* (Graves et al., 2010), nuevas especies que han sido descritas. Sin embargo, solo dos de ellas son patógenas: *L. ivanovii* que se considera patógena para los animales, y *L. monocytogenes*, que se considera la única patógena para el humano, aunque también es patógena para los animales (Vásquez-Boland et al., 2001; Velge y Roche, 2010; Bakker et al., 2010; Leclercq et al., 2010).

L. monocytogenes es una bacteria ubicua, es decir, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, habiéndose aislado a partir del suelo, material vegetal alimentario, ensilaje y de las aguas superficiales, pero particularmente de los ambientes de procesamiento de alimentos, especialmente en locales refrigerados, aunque estos se limpien y desinfecten rutinariamente (Carpentier y Cerf, 2011; Ferreira et al., 2014), convirtiéndose responsable de numerosos brotes alimentarios (Waak et al., 2002; Freitag et al., 2009). Es también un residente transitorio del tracto intestinal en seres humanos, siendo el 2 - 10% de la población general portadora del microorganismo sin consecuencias aparentes para la salud (Buchanan et al., 2017). Su entrada en las plantas de procesamiento de alimentos puede ocurrir a través de muchas rutas diferentes, desde materias primas hasta superficies de contacto en las instalaciones o equipos de los trabajadores (Moretro y Langsrud, 2004). Siendo un contaminante habitual de alimentos listos para comer, como aves de corral, carne cruda, alimentos marinos, quesos blandos o semi-blandos

y leche no pasteurizada (O'Connor et al., 2010; Pesavento et al., 2010). Además, en los alimentos comerciales, la presencia de *L. monocytogenes* y otros *Listeria spp.* no suele ser debido a fallas en la limpieza y desinfección, sino a la contaminación cruzada en el ambiente de post-procesamiento (Latorre et al., 2010).

Este patógeno mesófilo, tiene forma de bastoncillo, es Gram-positivo, catalasa negativo, anaerobio facultativo, no esporulante y psicrótrofo (Wilks et al., 2006). Su capacidad de sobrevivir a las bajas temperaturas (0.4 – 45°C) con un óptimo de 30°C, bajo pH (4.6 - 9.5), en una actividad de agua tan baja como 0.92, altas concentraciones de sal (10 - 20%) (Herald y Zottola, 1988; Liu, 2006; Gandhi y Chikindas, 2007), exposición a la radiación UV y a la desecación, contribuyen a que pueda persistir en los entornos del procesamiento de alimentos y contaminar así los productos alimenticios (Gandhi y Chikindas, 2007; Slama et al., 2012).

L. monocytogenes tiene la capacidad de adherirse y formar biofilms sobre las superficies de trabajo y equipos de procesamiento de alimentos, donde se acumulan los residuos de alimentos (Gandhi y Chikindas, 2007). Este es un mecanismo de resistencia potencial a agentes antimicrobianos, biocidas y calor (Cloete, 2003). La resistencia de las bacterias unidas, hacia los biocidas se ha asociado principalmente con la protección mecánica debido a la síntesis de exopolisacáridos (EPS) y los nutrientes circundantes, o con factores fisiológicos intrínsecos, tales como la adaptación de las células del biofilm a las tensiones, por ejemplo, ácido, estrés oxidativo, inanición, etc. (Somers y Wong, 2004; Pan et al., 2006).

Una serie de estudios sobre materiales comúnmente utilizados en instalaciones y locales de alimentos han demostrado la presencia de *L. monocytogenes* (Moretro y Langsrud, 2004), demostrando su capacidad de adherirse y desarrollarse en varias superficies en contacto con los

alimentos , tal como poliestireno usado por ejemplo como material de construcción en los desagües; politetrafluoroetileno, PTFE, (Chavant et al., 2002) utilizados en cintas transportadoras; acero inoxidable (Kalmokoff et al., 2001) utilizado en casas de humo o ahumadores; poliéster (Blackman y Frank, 1996) utilizado como sellador de suelo; caucho (Ronner y Wong, 1993) utilizado en juntas y vidrio (Borucki et al., 2003); vidrio y teflón (Meyer, 2003; Renier et al., 2011). Sin embargo, el grado en que *L. monocytogenes* se adhiere a estos materiales difiere en cada tipo.

L. monocytogenes dentro del biofilm es reacia a los tratamientos de limpieza y desinfección convencionales y, en consecuencia, persiste en las instalaciones durante largos periodos de tiempo (Somers y Wong, 2004; Wulff et al., 2006; Pesavento et al., 2010; Vongkamjan et al., 2013). Miettinen et al. (1999) mostraron la capacidad persistente de *L. monocytogenes* en una planta de helado durante 7 años, de la misma forma Wilks et al. (2006) encontraron que *L. monocytogenes* puede sobrevivir en materiales vegetales durante un período de hasta 10 a 12 años.

Esto refleja la relevancia de los biofilms para la industria alimentaria (Moretro y Langsrud, 2004) e identifica a *L. monocytogenes* como una preocupación importante (Cappitelli et al., 2014). En consecuencia, el control de biofilms de *L. monocytogenes* en las industrias de procesamiento de alimentos es de vital importancia, para aumentar la seguridad alimentaria y reducir las pérdidas económicas debidas a brotes de listeriosis.

2.2.2. Formación de biofilm por *L. monocytogenes*

El recubrimiento de una superficie por *L. monocytogenes* depende también de las condiciones ambientales incluyendo el medio, la temperatura, el pH, las condiciones hidrodinámicas y las cepas (Djordjevic et al, 2002; Borucki et al., 2003; Tresse et al., 2007; Kumar et al., 2009). Por ejemplo, los flagelos desempeñan un papel predominante, al menos en las primeras etapas de la formación de biofilm. En *L. monocytogenes*, la temperatura regula la flagelación de las células (Lemon et al., 2007; Todhanakasem y Young, 2008). Por lo que, el efecto de la temperatura sobre la formación de biofilm de *L. monocytogenes* ha sido ampliamente investigado (Moens y Vanderleyden, 1996; Peel, Donachie y Shaw, 1988), es así que se ha determinado que *L. monocytogenes* es flagelado y motil a temperaturas $\leq 30^{\circ}\text{C}$, y generalmente no flagelado y no motil a temperaturas mayor a 30°C (Grundling et al., 2004). A temperaturas bajas, la producción de flagelos por *L. monocytogenes* puede aumentar y se ha demostrado durante mucho tiempo como un medio de unión (Tresse et al., 2009). Aunque el apego mediado por flagelos es un medio demostrado de iniciación en la formación del biofilm (Lemon et al., 2007), *L. monocytogenes* puede adherirse a superficies inertes a través de un proceso de unión pasivo independiente de flagelos (Tresse et al., 2009). Tresse et al. (2007) también han reportado una dependencia del pH para la flagelación de *L. monocytogenes*, y sus consecuencias sobre la adhesión celular.

Es de suponerse que todas las variables mencionadas no influyen en el mismo grado al desarrollo del biofilm; por ejemplo, Poimenidou et al. (2016) determinó que el impacto de la disponibilidad de nutrientes en la formación de biofilm fue mayor que la temperatura para cepas de *L. monocytogenes* sobre acero inoxidable.

La mayor parte del conocimiento sobre la formación de biofilms mono-especies de *L. monocytogenes* se ha obtenido estudiando la adhesión bacteriana a las superficies o la arquitectura del biofilm (Norwood y Gilmour, 1999; Lunden et al., 2000; Kalmokoff et al 2001; Borucki et al., 2003). Entre la adhesión de una sola célula a la superficie y el desarrollo de una estructura tridimensional, la iniciación del biofilm pasa por una estructura inicial bidimensional (estructura 2-D) que no ha sido claramente descrita para *L. monocytogenes*. Además, no hay evidencia de una correlación entre las cepas de *L. monocytogenes*, las condiciones ambientales y esta estructura bidimensional inicial del biofilm (Pilchová, 2014).

Estudios anteriores han identificado numerosos genes asociados con la formación de biofilms de *L. monocytogenes* a temperaturas entre 30 - 37°C; sin embargo, no se han realizado a temperaturas comúnmente asociadas con el procesamiento de alimentos (10 - 20°C). Aún no se tiene referencias si los genes involucrados en la formación de biofilm difieren a las temperaturas de procesamiento de alimentos, pero puede ser probable, considerando que la temperatura ambiental altera la hidrofobicidad de la superficie celular (Di Bonaventura et al., 2008), la motilidad (Mauder et al., 2008), y la expresión de otros factores genéticos en *L. monocytogenes* (McGann et al., 2007).

2.2.3. Estructura del biofilm formado por *L. monocytogenes*

Los biofilms producidos por *L. monocytogenes* son estructuralmente simples en comparación con los producidos por muchos otros microorganismos (Kalmokoff et al., 2001; Rieu et al., 2008). Las arquitecturas principales descritas para biofilms listeriales muestran formas de setas, panales y redondas (Hall- Stoodley y Stoodley, 2002; Rieu et al., 2008). Las poblaciones de *L. monocytogenes* pueden alcanzar 4-6 log UFC/cm² pero no forma siempre biofilms multicapa

gruesos (9-12 log UFC/cm²) como hacen muchas otras bacterias (Gram et al., 2007; Oliveira et al., 2010).

2.2.4. Serotipos

Se conoce que todas las cepas de *L. monocytogenes* muestran tanto diversidad genética como serotípica (Zhang et al., 2003). La diversidad serotípica tiene su origen a partir de las combinaciones de los antígenos somático (O) y flagelar (H), resultando un total de trece serotipos reconocidos dentro de la especie (Pan et al., 2009): 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7. En base a estudios moleculares, las cepas de *L. monocytogenes* pueden clasificarse en tres grupos genéticos denominados linajes (Velge y Roche, 2010). El linaje I contiene serotipos 4b, 1/2b, 3b, 4d, 4e y 7; el linaje II, serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c; el linaje III incluye tres grupos, IIIA, IIIB y IIIC, (Den Bakker et al., 2008; Velge y Roche, 2010) y los serotipos 4a y 4c (Den Bakker et al., 2008; Velge y Roche, 2010).

El linaje I contiene todas las cepas epidémicas de brotes y casos de listeriosis humanas clínicas y transmitidas por alimentos (Den Bakker et al., 2008). El linaje II contiene a cepas adaptadas al medio ambiente, además contiene aislamientos de casos de humanos y animales, y de alimentos (Den Bakker et al., 2008; Velge y Roche, 2010). El linaje III está asociado con aislamientos de animales, pocas listeriosis humanas se han descrito en este linaje (Den Bakker et al., 2008; Velge y Roche, 2010).

En las últimas investigaciones sobre subtipificación molecular de *L. monocytogenes*, se reporta la existencia de un cuarto linaje (Ward et al., 2008; Bakker et al., 2010) conformado por los serotipos pertenecientes al grupo IIIB, que es genéticamente diferente al linaje III (Ward et al.,

2008) y está asociado con aislamientos de humanos, de animales y de alimentos (Ward et al., 2008).

Más del 90% de los casos de listeriosis humana se atribuyen a sólo cuatro serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b), siendo el serotipo 4b el que causa más del 50% de los casos de listeriosis en todo el mundo y que representa casi todos los casos brotes de origen alimentario en humanos y la listeriosis perinatal (Vazquez-Boland et al., 2001; Zhang et al., 2003). Obsérvese que los serotipos 1/2a y 1/2c pertenecen al linaje II, mientras que las cepas 1/2b y 4b representan el linaje I.

2.2.5. Listeriosis

L. monocytogenes es una bacteria patógena que causa una enfermedad transmitida por los alimentos, la listeriosis, que afecta principalmente a mujeres embarazadas, ya que puede causar parto prematuro o aborto involuntario, afecta también a neonatos, recién nacidos, ancianos, y lo que es más preocupante, a individuos inmunocomprometidos (Carpentier y Clerf, 2011). La listeriosis también se asocia a complicaciones de aparición tardía tales como meningitis, encefalitis, infección del sistema nervioso central en recién nacidos y pacientes inmunocomprometidos (Swaminathan y Gerner Smidt, 2007). Aunque *L. monocytogenes* es responsable de solo el 1% de las enfermedades transmitidas por los alimentos, considerablemente inferior a lo que causa otros patógenos, su tasa de mortalidad es extremadamente alta (20 - 40%), superando con gran ventaja la causada por otros patógenos alimentarios (Sofos y Geornaras, 2010; Gomez et al., 2014).

L. monocytogenes ha estado implicada en varios brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en las últimas décadas, en diferentes países, con una variedad de alimentos (Ferreira et al., 2014). La contaminación posterior al procesamiento de alimentos con *L. monocytogenes* ha sido reconocida como la causa principal de brotes de listeriosis (Wilks et al., 2006; Gandhi y Chikindas, 2007), siendo los casos esporádicos asociados generalmente con alimentos listos para el consumo (RTE, *Ready to eat*) que se mantienen durante períodos prolongados a temperaturas de refrigeración o de enfriamiento (Buchanan et al., 2017). Se han registrado otros brotes relacionados con otros alimentos como los mariscos, melón, manzanas (CDC, 2015a), helado (CDC, 2015b), etc. A pesar de que la legislación europea y estadounidense tiene normas estrictas sobre el material que entra en contacto con los alimentos, los brotes epidémicos causados por agentes zoonóticos son frecuentemente reportados (Ferreira et al., 2014, Halberg Larsen et al., 2014). En una estimación, cerca de 1470 casos de listeriosis con una tasa de mortalidad del 12.7% se informaron en los países europeos durante el año 2011 (EFSA, 2013), los alimentos implicados eran sándwiches, productos de panadería, carne y queso (EFSA, 2013). En el 2013 la EFSA informó 1763 casos humanos confirmados de listeriosis notificados en 27 Estados miembros (EFSA, 2015). En promedio, el 99,1% de los casos fueron hospitalizados, que es la mayor proporción de casos hospitalizados de todas las zoonosis bajo vigilancia de la UE. Los vehículos implicados fueron: Crustáceos, moluscos y moluscos y sus productos, queso, carne y productos cárnicos, carne de porcino y sus productos, hortalizas (ensalada mixta) y jugos (EFSA, 2015). Para el año 2015, la tasa de infección por listeriosis ha aumentado en un 16% (EFSA, 2015). En el caso de los Estados Unidos, entre el 2011-2014, 183 personas fueron infectadas con la cepa de *L. monocytogenes* asociada con el brote, lo que resultó en 39 muertes. Dichas infecciones se asociaron con alimentos, en particular, con tres marcas diferentes de queso

y melón cantalupo. En Canadá, en el 2008, se asoció un brote causado por la presencia de biofilms de *L. monocytogenes* en instalaciones de procesamiento de carne en lata (Knabel et al., 2012).

Se han postulado varias razones para explicar el aparente y deficiente control de este patógeno en la industria alimentaria: falta de sensibilidad entre los métodos que conducen a una detección inadecuada de *L. monocytogenes* debido a la existencia de células viables no cultivables (Dinu et al., 2009), procedimientos ineficientes para la limpieza y desinfección (Campdepadrós et al., 2012) y principalmente la formación de biofilm por *L. monocytogenes* y posterior aumento de su capacidad para resistir desinfectantes (Pan et al., 2006 ; Ibusquiza et al., 2011).

2.2.6. Persistencia en las instalaciones de la industria alimentaria

En su revisión, Moretro y Langsrud (2004) citaron 21 estudios en los que se demostró la persistencia de cepas de *L. monocytogenes*, y aún se siguen publicando estudios similares (Ortiz et al., 2010). Las cepas de *L. monocytogenes* que persisten en los ambientes alimentarios producen biofilms más fuertes que las cepas que son aisladas esporádicamente (Lunden et al., 2000), esto indica que la producción de biofilm es una estrategia de supervivencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de procesamiento de alimentos. Aunque algunos estudios encontraron que las cepas persistentes eran menos sensibles que las cepas transitorias, otras no encontraron tal correlación (Ferreira et al., 2014).

La presencia de *L. monocytogenes* en los establecimientos de procesamiento de alimentos es una consideración importante. Después de entrar a la instalación, *L. monocytogenes* puede convertirse en un residente de larga duración, pudiendo persistir durante meses o años en lugares

como los drenajes de planta. La capacidad de *L. monocytogenes* para unirse y formar un biofilm, por ejemplo, en diferentes superficies de las plantas de procesamiento, ha sido previamente documentada (Zhao et al., 2013), y los subtipos persistentes son reconocidos como fuertemente adherentes y especialmente poderosos productores de biofilm (Lunden et al., 2000). Además, *L. monocytogenes* puede unirse a superficies previamente colonizadas por otras bacterias y formar biofilms de especies mixtas con, por ejemplo, *Pseudomonas* (Hassan et al., 2004). Los mecanismos por los que las células sobreviven bajo estas condiciones no se entienden completamente (Harvey et al., 2007). Por lo tanto, se cree que los biofilms de *L. monocytogenes* juegan un papel importante en su supervivencia en el ambiente de procesamiento de alimentos (Zhao et al., 2013).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Lugar de ejecución del estudio

El lugar donde se realizó la presente investigación fue el laboratorio de Higiene e Inspección de los Alimentos, dentro del Grupo de Investigación de Análisis Microbiológico de Superficies y Evaluación de Biofilms (AMicS), perteneciente al Departamento de Ciencia animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona – España.

3.2. Preparación de las superficies de ensayo

Las superficies de ensayo empleadas fueron discos de acero inoxidable AISI 316 2B (AISI, *American Iron and Steel Institute*), de 2 cm de diámetro y 1 mm de grosor. Dicho material fue elegido por ser resistente a los ácidos no oxidantes y a la corrosión por hendidura y por picadura, tener buena resistencia mecánica y alta tenacidad incluso a temperaturas criogénicas, y además, por ser un material empleado en piezas y elementos de la industria de lácteos, frutas, verduras, alcohólica, panificadora, entre otros (Heubner, 2009).

El proceso de limpieza y desinfección de los discos de acero inoxidable se basaron en las indicaciones de la norma europea UNE-EN 13697 referente a ensayos en superficies no porosas (AENOR, 2002). En dicho proceso, los discos de acero inoxidable fueron sumergidos en una solución acuosa con un detergente no bactericida (Lavavajillas Manual Ge, ADIS Higiene, Spain) durante 1 hora, y después fueron 3 veces lavados con agua destilada durante 10 segundos. Posteriormente se sumergieron en isopropanol al 70% durante 15 minutos y se secaron en

cámara de flujo laminar. Además, con el objetivo de asegurar la esterilidad completa de los discos, éstos fueron autoclavados durante 15 minutos a 121°C, antes de empezar los ensayos.

3.3. Reactivación de las cepas de *L. monocytogenes*

Se emplearon diecisiete cepas de *L. monocytogenes* (Tabla 1), de las cuales doce cepas procedieron de aislamientos previos en industrias alimentarias, realizadas por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria – España (INIA). Las otras cinco cepas procedieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), consideradas como cepas de referencia.

Las diecisiete cepas forman parte de la colección del laboratorio y estaban almacenadas en estado liofilizado. Para reactivarlas, éstas se cultivaron en medio TSB (Caldo de soja triptona) durante 48 horas a una temperatura de 30°C. Posteriormente, la suspensión fue sembrada por agotamiento en placas con TSA (Agar de soja triptona) y cultivadas a 30°C durante 48 horas. Finalmente, se aislaron colonias las que fueron resembradas en nuevas placas con TSA y se incubaron a 37°C durante 24 horas, consiguiendo con ello un cultivo puro de las cepas seleccionadas, para posteriormente ser conservadas en refrigeración por un periodo máximo de un mes.

Tabla 1
Cepas de *L. monocytogenes* empleadas en el estudio

Cepa	Serotipo	Origen
4423	1/2a	INIA
5366	4b	CECT
5672	4b	CECT
5873	1/2a	CECT
911	1/2c	CECT
935	1/2b	CECT
A7	-	INIA
CDL69	1/2a	INIA
EGD-e	1/2a	INIA
P12	-	INIA
R6	-	INIA
S1(R)	-	INIA
S1(S)	-	INIA
S10-1	2a	INIA
S2-1	-	INIA
S2-2	-	INIA
S2 ^{BAC}	1/2a	INIA

Nota: Estos aislamientos fueron obtenidos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria – España (INIA) y la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). El símbolo “ - ” hace referencia a que aún no se ha reportado a que serotipo pertenece la cepa.

3.4. Preparación del inóculo

Para cada ensayo, las cepas fueron resembradas en TSA e incubadas a 37°C durante 24 horas antes de la preparación del inóculo, con el objetivo de trabajar con cepas del mismo tiempo de vida. Para la preparación del inóculo, se tomó una colonia y se inoculó en un tubo de ensayo que

contenía 10 ml de medio sTSYEB (Caldo de triptona soja y extracto de levadura, suplementado con cloruro de sodio y glucosa), medio ideal para una buena formación de biofilms por *L. monocytogenes* (Pan et al., 2010), hasta obtener una concentración aproximada de 10^6 UFC/ml, que equivale a una turbidez de 0.0 - 0.1 unidades McFarland, empleando para ello un densímetro de la marca DENSIMAT (BioMérieux, France).

3.5. Formación de los biofilms

Para formar los biofilms, se inocularon 30 μ l de la suspensión bacteriana de ensayo sobre cada disco. Los discos fueron colocados previamente a su inoculación en placas de Petri, y a su vez, éstas fueron colocadas en un recipiente cerrado con humedad saturada, con el objetivo de evitar el secado y propiciar la formación del biofilm, donde seguidamente se incubó a una temperatura de 30°C durante 7 días (168 horas). Durante dicho periodo de incubación, se realizaron lavados y reposición de nutrientes a las 24, 48, 96 y 168 horas desde el inicio de la inoculación sobre el disco. Para el lavado de cada disco se utilizó 6 ml de agua estéril, y para la reposición de nutrientes 30 μ l de medio sTSYEB estéril.

3.6. Evaluación

3.6.1. Recuento de las células del biofilm por sistema TEMPO®

El equipo del sistema TEMPO® es fabricado por los laboratorios de BioMérieux, el cual se presenta como una solución automatizada para el recuento de la contaminación microbiológica en productos alimenticios y superficies de trabajo, pudiendo analizar hasta 500 test diarios, con lo que se consigue ahorrar tiempo y costos. Fundamentalmente es un método rápido y automatizado, que logra miniaturizar la técnica del Numero Más Probable (NMP), y ha sido

validado por la AOAC internacional y la AFNOR. Este sistema cuenta con tres estaciones de trabajo: TEMPO[®] filler, TEMPO[®] prep y TEMPO[®] reader, además de viales que contienen un medio de cultivo específico para el tipo de recuento que se vaya a hacer y tarjetas que servirán para la incubación de las muestras. Estas tarjetas contienen 16 pocillos, en donde el tamaño del pocillo corresponde a niveles de dilución de 1 a 3.

Para el recuento de las células presentes en el biofilm vía sistema TEMPO[®], fue necesario desprender dichas células de la superficie. Para ello, los discos fueron lavados con 6 ml de agua destilada estéril a una presión adecuada con el principal objetivo de remover todas aquellas células que no se encontraban adheridas a la superficie y que por lo tanto no formaban parte del biofilm. Una vez finalizado el lavado, los discos fueron colocados en frascos que contenían 10 ml de neutralizante (ver composición en ANEXO A), empleado por impedir el crecimiento celular, y 8.5 g de perlas de vidrio. Los frascos fueron sometidos a una fuerza mecánica en movimiento otorgado por un agitador tipo vórtex, durante 1 minuto y 30 segundos para así lograr desprender las células adheridas al disco. Posteriormente, a partir de la suspensión obtenida se realizaron diluciones seriadas en TSS (Solución salina de triptona), y a partir de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} se realizó el recuento por el sistema TEMPO[®]. Para ello, primero los viales, que contenían un medio específico para el recuento de aerobios totales y un indicador fluorescente de crecimiento, fueron hidratados con 3 ml de agua destilada estéril. A este vial, se le añadió 1 ml de la suspensión bacteriana de la dilución correspondiente, teniendo de esta forma una dilución final 1:4. Los viales fueron homogenizados por agitación en vórtex y su contenido fue traspasado hacia unas tarjetas empleando la unidad de llenado (TEMPO[®] filler). Dichas tarjetas presentan un código de barras que otorgan trazabilidad a las muestras. Seguidamente, estas tarjetas fueron llevadas a la estación TEMPO[®] prep, donde se registró el código de barras de cada tarjeta en una

base de datos. Posteriormente, las tarjetas se incubaron a 30°C durante 48 horas. Terminado el periodo de incubación, las tarjetas fueron leídas en la unidad TEMPO[®] reader, donde el sistema emplea métodos estadísticos para calcular el número de microorganismos presentes en la muestra inicial en UFC/ml.

3.6.2. Recuento de las células del biofilm por recuento en placa

Para el recuento en placa, se siguió el mismo procedimiento de lavado y desprendimiento de las células adheridas sobre los discos empleados por el método anterior, hasta obtener las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} de la muestra en medio TSS. Una vez obtenidas estas diluciones, se inoculó 1 ml de la dilución correspondiente en una placa Petri y se le añadió el medio TSA licuado. La muestra se homogenizó dando unos leves movimientos para que el inóculo se dispersara en todo el medio y, una vez solidificado, se incubó a una temperatura de 30°C durante 48 horas.

3.6.3. Recuento de las células del biofilm por microscopía de epifluorescencia directa (DEM)

Para este método se empleó el microscopio de epifluorescencia Olympus BX51/BX52 (Olympus, Japan), el cual emplea como fuente de energía una lámpara de mercurio de alta presión, con un suministro de energía para 100 W (U-RFL-T-200, Olympus). Para la toma de fotografías se empleó una cámara digital Olympus DP73 acoplada al microscopio, y para el análisis de la imagen se utilizó el software cellSens Dimension de Olympus que fue incorporado en un sistema informático conectado al microscopio. Para poder visualizar y diferenciar las células viables de las muertas o dañadas se empleó el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD[®] BacLight[™] - 13152, este kit contiene dos colorantes, SYTO[®] 9 (colorante fluorescente verde) y

yoduro de propidio (colorante fluorescente rojo), ambos reactivos están contenidos en una solución de dimetilsulfóxido anhidro (Boulos et al, 1999). Estos colorantes se fijan al ácido nucleico de la célula y su mecanismo de acción está basado en las características de permeabilidad de la membrana celular (Molecular Probes, 1995). Aquellas células que poseen una membrana celular intacta serán permeables solo al SYTO[®] 9 y no al yoduro de propidio (aunque éste colorante también tiñe las células dañadas), en consecuencia, la célula se teñirá de verde (célula viable). Sin embargo, cuando la membrana celular se encuentra dañada los dos colorantes van a penetrar, el SYTO[®] 9 en presencia de yoduro de propidio se va a reducir y manifestará una coloración roja, en consecuencia, las células se teñirán de rojo (célula no viable) (Vives-Rego et al., 2000).

Para el recuento por microscopía de epifluorescencia directa, al igual que las pruebas anteriores, se lavó el disco con agua destilada estéril para eliminar las células no adheridas a la superficie. En este caso, no se realizó el desprendimiento de las células adheridas como en los métodos anteriores, ya que éste evalúa la contaminación microbiana directamente sobre la superficie sin necesidad de realizar pasos intermedios. Una vez terminado el lavado, se tomó un disco y se colocó sobre una lámina portaobjeto. Sobre el disco se añadió 5 µl del kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD[®] BacLight™ - 13152 y sobre él se colocó un cubre-objeto. Los discos teñidos se dejaron en oscuridad durante 5 minutos (debido a la sensibilidad a la luz del reactivo) con el objetivo de que el colorante actuara en la muestra y luego se llevó al microscopio. En el microscopio se realizaron 5 fotografías al azar y en diferentes planos de los discos a un aumento de 20X, pudiéndose observar las células viables y no viables, además de la sustancia polimérica extracelular que nos indicaba presencia de biofilm maduro. Las imágenes fueron tratadas mediante el software cellSens Dimension, con el que se obtuvo automáticamente el área total

ocupada por las células adheridas que conforman el biofilm y el área promedio de cada célula. Con estos dos valores se pudo obtener el número de células presentes en el biofilm, dividiendo el área total ocupada por el área promedio de la célula. Los datos obtenidos fueron expresados como el logaritmo de las UFC (unidades formadoras de colonias) por centímetro cuadrado.

3.7. Análisis estadístico

Para los ensayos correspondientes a la evaluación por microscopía de epifluorescencia directa se realizaron por duplicado en tres experimentos distintos (n=6). Para la evaluación por sistema TEMPO[®] y por recuento en placa se realizaron por cuadruplicado en tres experimentos distintos (n=12). Dichos ensayos se realizaron para las diecisiete cepas en días distintos.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa IBM[®] SPSS[®] Statistics versión 21.0. Para la comparación de las medias se utilizó el test de “One Way ANOVA” y el test de “Duncan”, con el objetivo de observar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos obtenidos por todas las cepas con respecto a cada uno de los métodos, y los recuentos obtenidos por los tres métodos para cada una de las cepas evaluadas. En ambos test se empleó un nivel de significación de $P < 0.05$. Además, se calcularon curvas de regresión para determinar la relación entre los métodos y el mejor modelo para su ajuste.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los objetivos planteados en el presente estudio, y una vez formados los biofilms sobre los discos de acero inoxidable, se procedió a evaluarlos por microscopía de epifluorescencia directa, sistema TEMPO[®] y recuento en placa, con el fin de determinar las cepas de mayor producción de biofilm mediante el recuento de células totales que, una vez finalizado el proceso, permanecieron adheridas a la superficie. Además, se hizo una comparación de la eficacia de los métodos en cuanto a la cuantificación de las células presentes en el biofilm. La Tabla 2 muestra los resultados de los recuentos obtenidos por cada uno de los métodos, expresados en unidades logarítmicas, además de mostrarse la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos obtenidos por los tres métodos para cada cepa, y los obtenidos por todas las cepas con respecto a un método en concreto. Para dicho fin se empleó, como ya se mencionó, el test de “One Way ANOVA” y el test de “Duncan”.

Tabla 2**Recuento de las células presentes en los biofilms evaluados por los tres métodos**

Cepa	Rto. DEM		Rto. TEMPO [®]		Rto. en Placa	
	UFC/cm ²	log UFC/cm ²	UFC/cm ²	log UFC/cm ²	UFC/cm ²	log UFC/cm ²
CECT 5672	2.17×10 ⁷	7.23 ^{Aa} ± 0.14	1.79×10 ⁶	6.09 ^{Bc d} ± 0.12	1.37×10 ⁶	5.93 ^{Bde f} ± 0.14
4423	1.02×10 ⁷	7.06 ^{Aab} ± 0.08	4.70×10 ⁶	6.61 ^{Ba} ± 0.07	3.98×10 ⁶	6.53 ^{Ba} ± 0.08
S2-1	1.08×10 ⁷	6.95 ^{Aabc} ± 0.11	3.23×10 ⁶	6.43 ^{Bab} ± 0.09	2.97×10 ⁶	6.43 ^{Bab} ± 0.06
S2 ^{BAC}	1.16×10 ⁷	6.94 ^{Aabc} ± 0.14	2.20×10 ⁶	6.29 ^{Babc} ± 0.07	2.49×10 ⁶	6.37 ^{Babc} ± 0.05
S2-2	1.05×10 ⁷	6.95 ^{Aabc} ± 0.10	2.24×10 ⁶	6.28 ^{Babc} ± 0.07	1.86×10 ⁶	6.23 ^{Babc d} ± 0.06
S10-1	4.17×10 ⁷	7.05 ^{Aabc} ± 0.28	2.03×10 ⁶	6.23 ^{Bbc d} ± 0.08	1.75×10 ⁶	6.17 ^{Bbc d} ± 0.07
EDG-e	1.07×10 ⁷	7.18 ^{Aa} ± 0.27	1.83×10 ⁶	6.17 ^{Bbc d} ± 0.08	1.60×10 ⁶	6.15 ^{Bbc d} ± 0.06
CECT 935	8.25×10 ⁶	6.79 ^{Aabc} ± 0.16	1.64×10 ⁶	6.08 ^{Bbc d} ± 0.10	1.34×10 ⁶	6.06 ^{Bc de} ± 0.07
R6	9.27×10 ⁶	6.81 ^{Aabc} ± 0.19	2.12×10 ⁶	6.26 ^{Bbc d} ± 0.07	7.42×10 ⁶	6.54 ^{ABa} ± 0.15
CECT 5873	8.33×10 ⁶	6.88 ^{Aabc} ± 0.09	1.02×10 ⁶	5.70 ^{Be} ± 0.18	1.15×10 ⁶	5.65 ^{Bfg} ± 0.18
CECT 5366	6.30×10 ⁶	6.77 ^{Aabc} ± 0.07	1.40×10 ⁶	6.10 ^{Bbc d} ± 0.06	1.26×10 ⁶	6.06 ^{Bc de} ± 0.06
CDL69	8.56×10 ⁶	6.91 ^{Aabc} ± 0.07	1.96×10 ⁶	6.20 ^{Bbc d} ± 0.09	1.91×10 ⁶	6.24 ^{Babc d} ± 0.06
S1(S)	4.51×10 ⁶	6.53 ^{Ac d} ± 0.17	1.66×10 ⁶	6.10 ^{Bbc d} ± 0.10	1.82×10 ⁶	6.15 ^{Bbc d} ± 0.10
S1(R)	8.39×10 ⁶	6.84 ^{Aabc} ± 0.12	2.31×10 ⁶	6.17 ^{Bbc d} ± 0.14	1.87×10 ⁶	6.09 ^{Bc d} ± 0.14
P12	7.53×10 ⁶	6.85 ^{Aabc} ± 0.07	1.54×10 ⁶	6.05 ^{Bc d} ± 0.11	1.72×10 ⁶	6.05 ^{Bc de} ± 0.13
A7	4.47×10 ⁶	6.58 ^{Abcd} ± 0.12	2.83×10 ⁶	5.91 ^{Bde} ± 0.19	6.79×10 ⁵	5.75 ^{Be fg} ± 0.08
CECT 911	2.98×10 ⁶	6.26 ^{Ad} ± 0.20	5.98×10 ⁵	5.62 ^{Be} ± 0.11	5.59×10 ⁵	5.58 ^{Bg} ± 0.12

^{A-B} Valores medios en una misma fila con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes (P < 0.05).^{a-g} Valores medios en una misma columna con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes (P < 0.05).

Rto.: Recuento

DEM: Microscopía de epifluorescencia directa

4.1. Evaluación de la formación de biofilm por las distintas cepas de *L. monocytogenes***mediante sistema TEMPO[®]**

Los resultados generados por el sistema TEMPO[®] se obtuvieron a partir del recuento de las células desprendidas de la superficie, producto del movimiento mecánico que favoreció la

fricción de las perlas de vidrio con la superficie. Mediante este método, *L. monocytogenes* 4423 y *L. monocytogenes* CECT 911 fueron la mayor y menor productora de biofilm, obteniendo recuentos de 4.70×10^6 y 5.98×10^5 UFC/cm², respectivamente (Tabla 2). Aunque no existe diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre la cepa mayor productora, CECT 4423, y las cepas que le siguen, sí que hubo entre ésta y la menor productora, CECT 911 ($P < 0.05$).

4.2. Evaluación de la formación de biofilm por las distintas cepas de *L. monocytogenes* mediante recuento en placa

Los resultados generados por recuento en placa, al igual que para el sistema TEMPO[®], se obtuvieron a partir del desprendimiento de las células adheridas a la superficie de acero inoxidable. Mediante este método la cepa *L. monocytogenes* R6 fue la mayor productora de biofilm con un recuento de 7.42×10^6 UFC/cm², aunque la cepa *L. monocytogenes* 4423 alcanzó un recuento de 3.98×10^6 UFC/cm², por lo que al no haber diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre ambos resultados se considerará a las dos cepas como las mayores productoras de biofilm mediante este método tradicional. Por el contrario, *L. monocytogenes* CECT 911 fue la cepa menos productora de biofilm con un recuento de 5.59×10^5 UFC/cm², presentando diferencias estadísticamente significativas con la mayor productora por este método ($P < 0.05$).

4.3. Evaluación de los biofilms producidos por las distintas cepas de *L. monocytogenes* mediante microscopía de epifluorescencia directa

En la Figura 6 se puede observar la variabilidad existente entre las cepas estudiadas respecto al grado de adherencia sobre el acero inoxidable, habiendo seguido el mismo protocolo para

formar los biofilms. Si bien el biofilm no solo es representado por las bacterias que lo agrupan, éste también incluye sustancias poliméricas extracelulares. Cabe mencionar que ésta última es producida por los mismos microorganismos, por lo que el nivel de la población en estado sésil (adherido a la superficie, y no en estado planctónico o libre) es un buen indicador para determinar la capacidad de formar biofilms por las cepas de *L. monocytogenes*. Lo anterior mencionado se relaciona con lo expuesto por Nilsson et al. (2011), quienes afirman que el desarrollo del biofilm está directamente influenciado por el nivel de biomasa unida, referido a la población microbiana adherida a la superficie.

En base a los resultados obtenidos por microscopía de epifluorescencia directa, *L. monocytogenes* CECT 5672 y CECT 911 con recuentos de 2.17×10^7 y 2.98×10^6 UFC/cm² son la cepa mayor y menor productora de biofilm, respectivamente (Tabla 2). Aunque no existe diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre la mayor productora, CECT 5672, y las cepas que le siguen, sí que existe entre ésta y la menos productora, CECT 911 ($P < 0.05$).

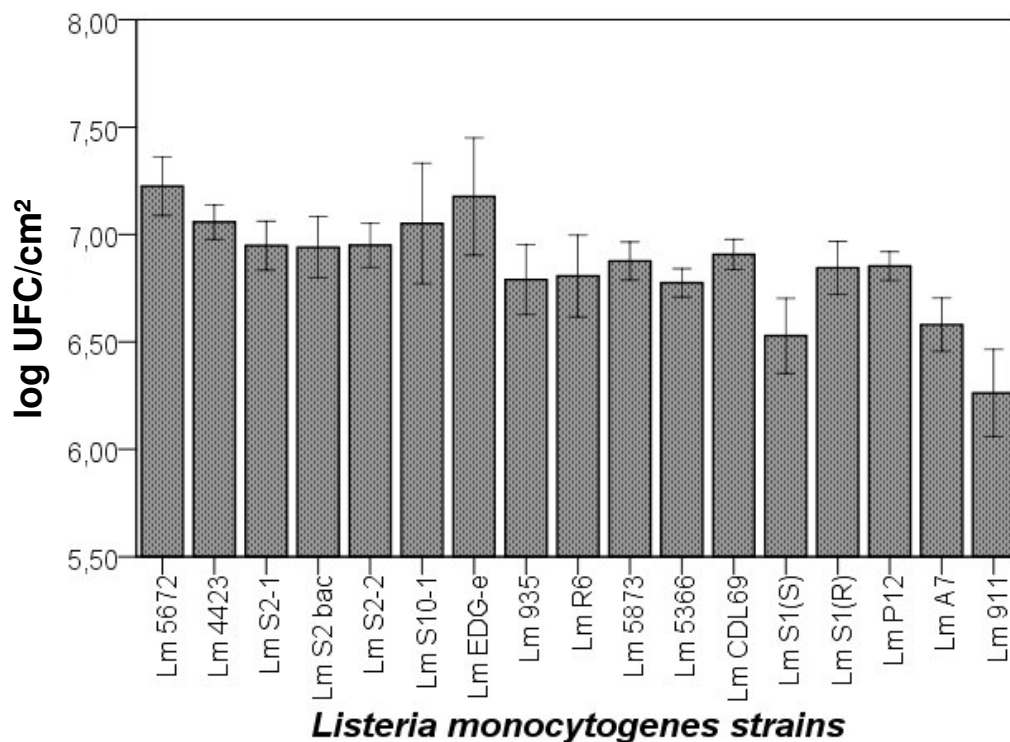


Figura 6. Recuento por microscopía de epifluorescencia directa, expresado en $\log(UFC)/cm^2$

La Figura 7 muestra los recuentos obtenidos respecto a la formación de biofilms por las distintas cepas de *L. monocytogenes* mediante el uso de la microscopía de epifluorescencia directa, previamente representados en la Figura 6, pero esta vez ordenados de mayor a menor producción de biofilms (de izquierda a derecha).

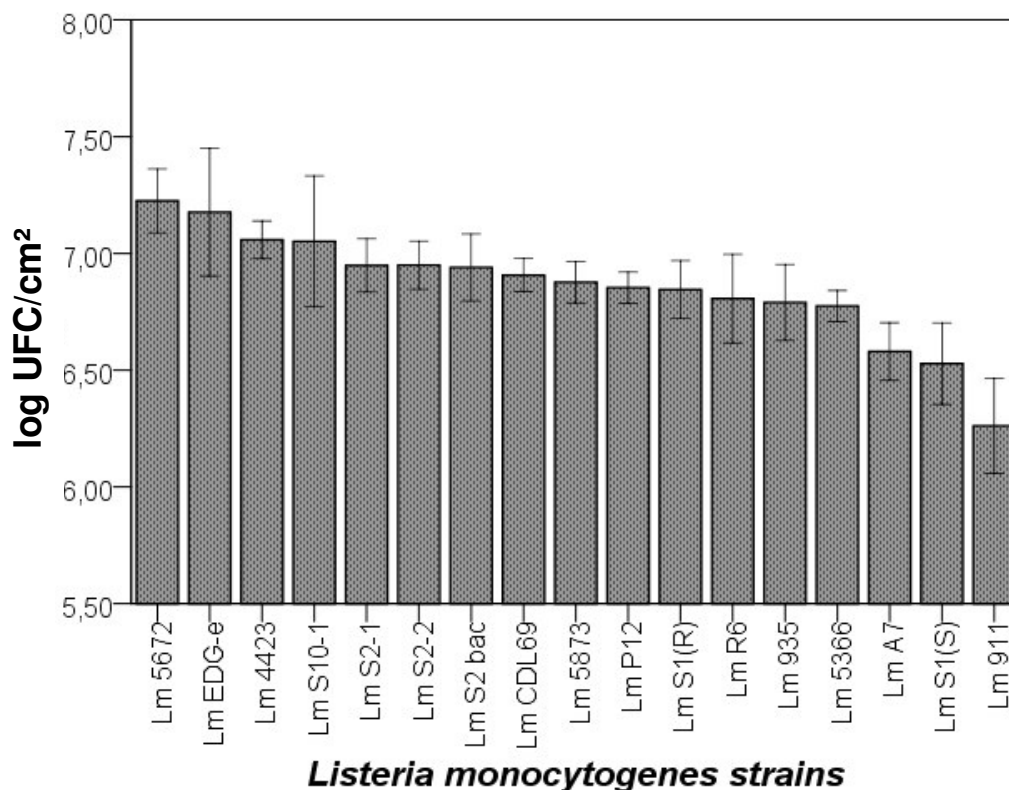


Figura 7. Recuentos obtenidos por microscopía de epifluorescencia directa de las cepas de *L. monocytogenes* ordenadas descendientemente en función de su capacidad de formación de biofilms.

En estudios previos realizados en el laboratorio, se trabajó también con las mismas diecisiete cepas de *L. monocytogenes* con el mismo objetivo, determinar su grado de capacidad para formar biofilms, pero el material de la superficie fue distinto (poliestireno), además de la técnica empleada (sembrado en placa de microtiter y empleo del cristal violeta para su detección y cuantificación mediante el uso de curvas patrón previamente establecidas). Los resultados de dicha investigación (datos no mostrados) permitieron también hacer un cribado en cuanto a la capacidad de formar biofilms por las distintas cepas de *L. monocytogenes* empleadas en el estudio. La comparación de los resultados de dicho estudio y el presente estudio se muestran en la Tabla 3. Como se puede apreciar, tanto *L. monocytogenes* CECT 5672 como *L. monocytogenes* CECT 911 son las cepas con mayor y menor capacidad para formar biofilm,

respectivamente, para ambos estudios, por lo que se podría considerar a *L. monocytogenes* CECT 5672 como una cepa crítica al ser altamente capaz de formar biofilms en estos materiales con alto índice de empleabilidad en la industria alimentaria. Si bien es cierto, hay algunas cepas donde la variación respecto a su posición en la tabla es mínima, sin embargo, existen otras como *L. monocytogenes* EDG-e que sobre una superficie de plástico se muestra medianamente productora de biofilm, en cambio, en acero inoxidable su capacidad para formar biofilm es significativamente alta. Ambos resultados ponen de manifiesto lo dicho por Whitehead et al. (2009) respecto a la influencia de las propiedades del tipo de superficie, como por ejemplo la hidrofobicidad, sobre la formación del biofilm. Ésta es uno de los factores determinantes para la adherencia de las bacterias y la posterior formación de biofilms, tal como lo muestran Djordjevic et al. (2002), quienes encontraron que la adhesión de *L. monocytogenes* al acero inoxidable fue dramáticamente inferior a la observada en el PVC, poniendo de manifiesto una vez más la influencia del tipo de superficie empleado. No obstante, esta adhesión inicial es un proceso multifactorial ya que no solo depende del tipo de superficie, sino también de las propiedades de la superficie celular (Takahashi et al., 2010), las condiciones ambientales (Ploux et al., 2010) y el estrés que genera en las células (Folsom et al., 2006; Pan et al., 2006; Begley et al., 2009).

Tabla 3

Comparación de la capacidad de las cepas de *L. monocytogenes* para formar biofilm sobre polietileno (previo estudio) y acero inoxidable (presente estudio)

Cepa/Superficie	Polietileno (estudio previo)	Acero inoxidable (estudio actual)
CECT 5672	1°	1°
4423	2°	3°
S2-1	3°	5°
S2 ^{BAC}	4°	7°
S2-2	5°	6°
S10-1	6°	4°
EDG-e	7°	2°
CECT 935	8°	13°
R6	9°	12°
CECT 5873	10°	9°
CECT 5366	11°	14°
CDL69	12°	8°
S1(S)	13°	16°
S1(R)	14°	11°
P12	15°	10°
A7	16°	15°
911	17°	17°

1°: Mayor productora de biofilm

17°: Menor productora de biofilm

Como ya se ha mencionado previamente, y en referencia a la cuantificación mediante el uso de microscopía de epifluorescencia directa, *L. monocytogenes* CECT 5672 fue la cepa mayor productora de biofilms sobre acero inoxidable (Figura 7). Además, tal y como también se ha detallado en la Tabla 1, esta cepa pertenece al serotipo 4b, adjudicado como responsable de más del 50% de los casos de listeriosis a nivel mundial, representando la mayoría de los brotes

transmitidos por los alimentos (Vazquez-Boland et al., 2001; Zhang et al., 2003). Los resultados obtenidos explicarían, en parte, la alta persistencia que tiene la cepa *L. monocytogenes* CECT 5672 en las instalaciones de la industria procesadora de alimentos, al ser altamente capaz de formar biofilms, y que por lo tanto posee resistencia al estrés ambiental y a los procedimientos de limpieza y desinfección convencionales, en consecuencia, podrá permanecer en las superficies de trabajo durante largos periodos de tiempo, generando la contaminación de los productos finales y pudiendo generar un brote alimentario, característico del serotipo al que pertenece.

En el mismo sentido, es importante mencionar a la cepa *L. monocytogenes* 4423, la cual según la Tabla 2 se presenta como la mayor productora de biofilm en acero inoxidable cuantificada por el sistema TEMPO[®] y recuento en placa, y la tercera productora observada mediante cuantificación por microscopía de epifluorescencia directa. Esta cepa, como se puede ver en la Tabla 1, pertenece al serotipo 1/2a y a su vez este serotipo pertenece al linaje II, el cual engloba a cepas adaptadas al medio ambiente y que poseen una mayor capacidad para multiplicarse en el mismo respecto a otros linajes (De Jesús y Whiting, 2003), y esto, explicaría por una parte la buena capacidad de formar biofilms en las instalaciones de la industria alimentaria. Además, en las investigaciones realizadas por Nilsson et al. (2011) y por Borucki et al. (2003) se evaluaron la capacidad de formación de biofilms de diferentes cepas de *L. monocytogenes*, determinándose que las cepas con mayor producción fueron las pertenecientes al serotipo 1/2a, además de registrarse en Estados Unidos 8 brotes asociados a alimentos contaminados con cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes a este serotipo (Cartwright et al., 2013).

Las Figuras 8, 9 y 10 representan solo una parte de las fotografías tomadas a los campos seleccionados al azar para cada una de las diecisiete cepas estudiadas, observadas por

microscopía de epifluorescencia directa a una amplitud de 20X. En ellas se puede observar desde la forma de la célula (bacilos cortos) hasta la distribución que tienen las colonias sobre la superficie (en algunos casos determinando formas geométricas, y en otros casos más dispersas). También se muestra una clara diferenciación entre las células viables (color verde) y las muertas o aquellas que presentan daño en su membrana celular (color rojo) gracias a la tinción de viabilidad LIVE/DEAD[®] aplicada.

Las diferencias observadas en cuanto a la distribución y el nivel poblacional de las células adheridas (Figuras 8, 9 y 10), puede ser explicada en parte por las diferencias en la motilidad (Mosquera-Fernández et al., 2014) entre las diferentes cepas estudiadas. Por su parte, Todhanakasem y Young (2008) discutieron la posible relación entre las oscilaciones del nivel poblacional y la motilidad de las cepas de *L. monocytogenes*, sin embargo, la motilidad es solo uno de los factores condicionantes para que se pueda dar la adhesión inicial del microorganismo a la superficie.

Mosquera-Fernández et al. (2014) evaluaron la formación de biofilm de *L. monocytogenes* CECT 5873, encontrando que esta cepa desarrolla biofilms poco densos a diferencia de otras cepas que también fueron estudiadas. Ello guarda cierta relación con nuestros resultados para la cepa CECT 5873, ya que se muestra como una cepa medianamente productora de biofilm (Figura 7) con una densidad poblacional de 6.88 ± 0.09 de células adheridas (Tabla 2). Además, la distribución y la forma de las colonias adheridas a la superficie fue distinta comparada con nuestro resultado (Figura 9, j), esto porque la superficie de ensayo empleada por estos investigadores fue de acero inoxidable de tipo AISI 304, diferente a la que se empleó en el presente estudio (tipo AISI 316). Ello pone en evidencia una vez más la influencia que tiene el

tipo de superficie sobre la formación de la estructura del biofilm y la distribución de las colonias dentro de éste.

Como se ha mencionado en el fundamento teórico, los canales de agua presentes en los biofilms (en su estadio de maduración), observados como espacios vacíos separando las microcolonias bacterianas presentes (Figura 2), cumplen la función principal de actuar como una vía de acceso de nutrientes y salida de desechos (Donlan, 2002). Los espacios vacíos que se muestran en la Figura 9, j correspondiente a la cepa CECT 5873 representarían aparentemente estos canales de agua. Las imágenes obtenidas por DEM muestran representaciones de dos dimensiones, por lo que no es la más adecuada para analizar la estructura de los biofilms bacterianos. Por lo tanto, para confirmar que dichos espacios vacíos mostrados en la Figura 9, j representan canales de agua es necesario que la estructura se muestre en tres dimensiones, esto es solo posible mediante el empleo de la microscopía confocal (Maukonen et al., 2003).

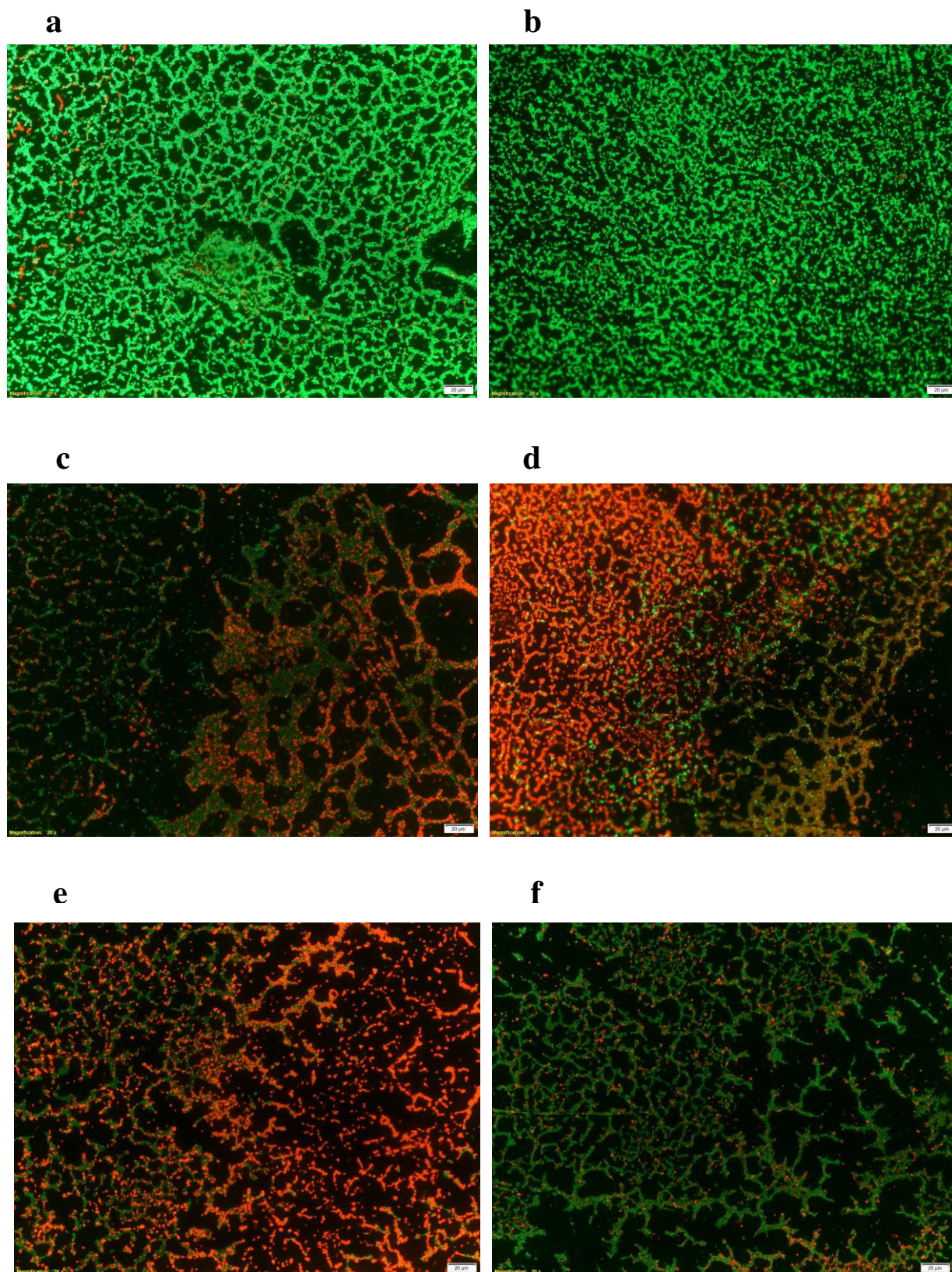


Figura 8. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia directa de cepas de *L. monocytogenes* a 20X post tinción con LIVE/DEAD®, incubados a 30°C durante 7 días, a) CECT 5672, b) 4423, c) S2-1, d) S2^{BAC}, e) S2-2, f) S10. El color rojo representa a las células muertas o lesionadas y el verde a las viables.

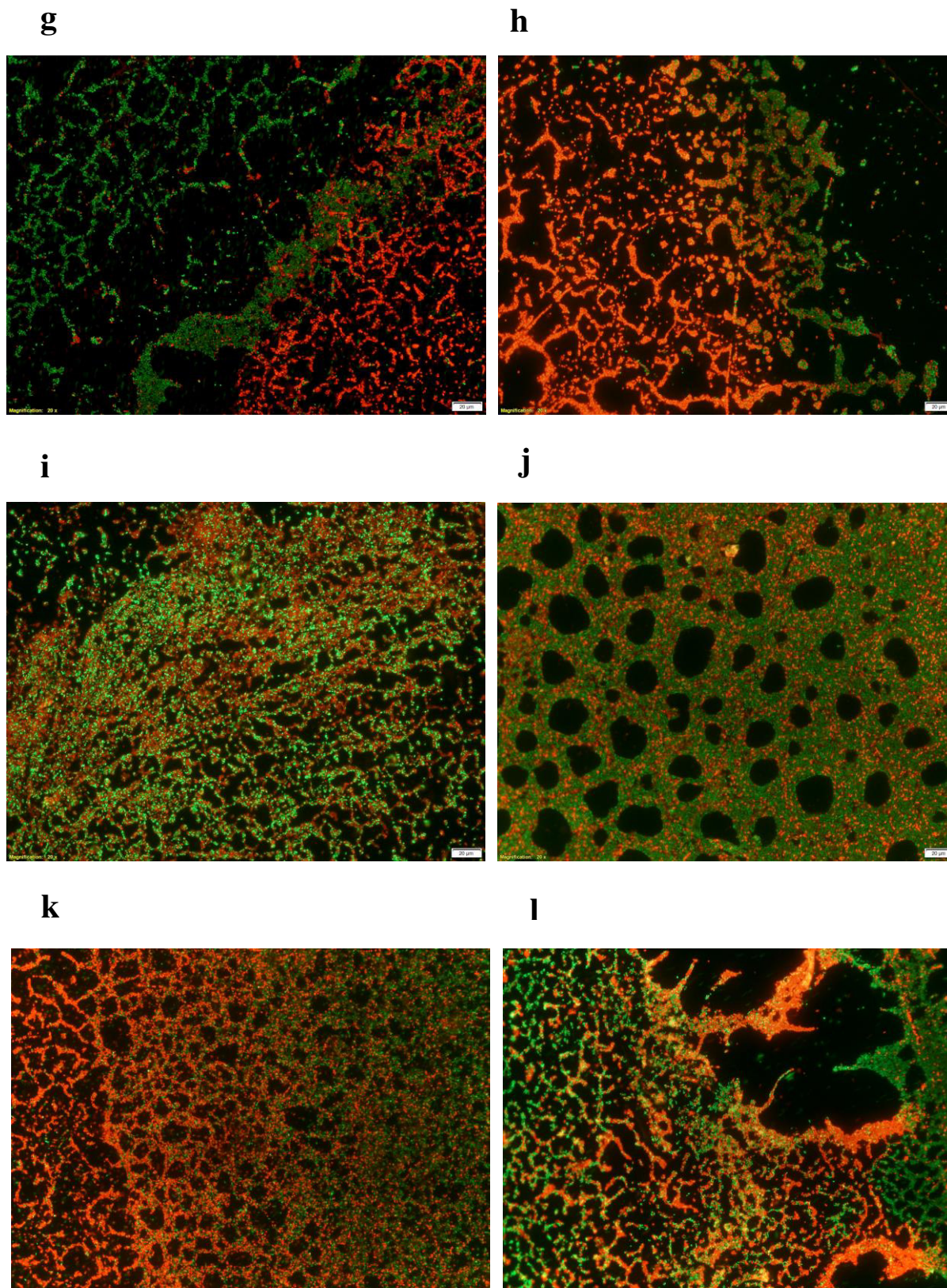


Figura 9. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia directa de cepas de *L. monocytogenes* a 20X post tinción con LIVE/DEAD®, incubados a 30°C durante 7 días, g) EDG-e, h) CECT 935, i) R6, j) CECT 5873, k) CECT 5366, l) CDL69. El color rojo representa a las células muertas o lesionadas y el verde a las viables.

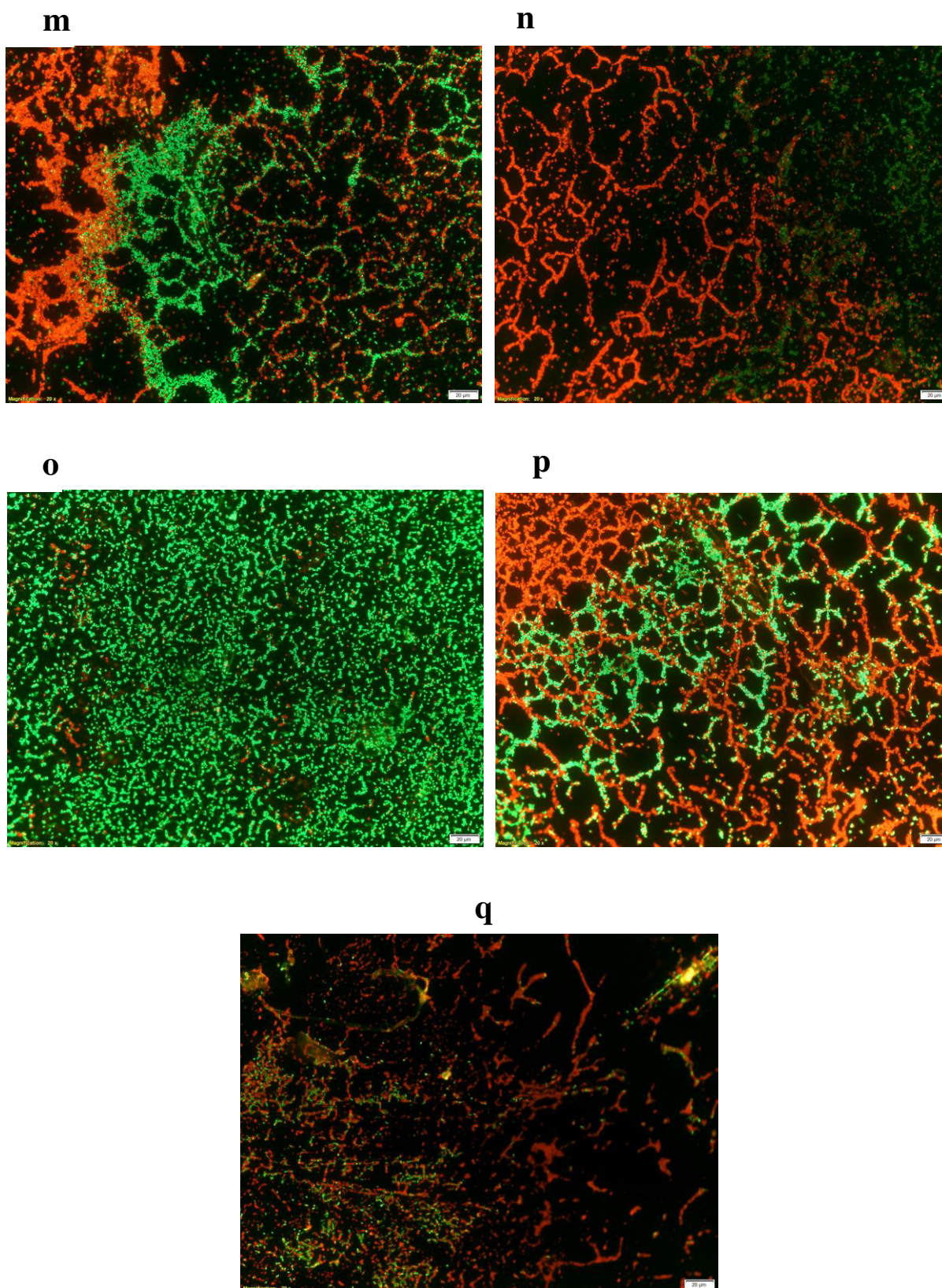


Figura 10. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia directa de cepas de *L. monocytogenes* a 20X post tinción con LIVE/DEAD®, incubados a 30°C durante 7 días, m) S1(S), n) S1(R), o) P12, p) A7, q) CECT 911. El color rojo representa a las células muertas o lesionadas y el verde a las viables.

Tal y como se ha detallado en el apartado correspondiente a la metodología, el empleo de la tinción de viabilidad LIVE/DEAD[®] en el análisis por microscopía de epifluorescencia directa pone en evidencia las células viables (color verde) y las células dañadas o muertas (color rojo) que forman parte del conjunto de células adheridas a la superficie y que constituyen el biofilm (Figuras 8, 9 y 10). En la Tabla 4 se muestran los porcentajes en cuanto a células viables y no viables para las diecisiete cepas estudiadas, ordenadas de la mayor productora de biofilms (1) a la menor productora (17). No se ha encontrado una relación directamente proporcional entre la capacidad de producción de biofilm y el porcentaje de células viables presentes en el biofilm evaluadas una vez terminado del periodo establecido, es decir, las cepas con mayor producción de biofilm no necesariamente son las que poseen los mayores porcentajes de células viables una vez finalizado los siete días de incubación establecidos. Lo que sí guarda una relación directamente proporcional con la viabilidad celular es el grado de maduración del biofilm con el porcentaje de células no viables, teniendo una reducción de las células viables en los biofilms maduros. De hecho, hay estudios que demuestran que en un biofilm joven existe alrededor de un 20% de células no viables, y entorno a un 50% en un biofilm maduro (Carpentier y Cerf, 1993; Sharma y Anand, 2002).

Con lo antes mencionado y en base a nuestros resultados, se puede afirmar que para un periodo de siete días *L. monocytogenes* A7 (76.99% no viables) y S10-1 (7.51% no viables) lograron el mayor y el menor grado de maduración del biofilm, respectivamente. Teniendo en cuenta que para todos los ensayos se cuidó que, durante el proceso de formación de los biofilms, la humedad siempre fuera alta y no se produjera la muerte de las células por desecación. Por esta razón, la sobreestimación de células no viables o muertas está descartada, con esa base y con los

resultados mostrados en la Tabla 4 se ha determinado que todas las cepas estudiadas requieren de diferentes periodos para que alcancen la madurez de su biofilm formado.

Tabla 4
Porcentaje de viabilidad de las células que forman el biofilm en las cepas estudiadas

Cepa	Orden descendente en producción de biofilm	Viables (%)	No viables (%)
CECT 5672	1°	68.17	31.72
EDG-e	2°	36.39	63.61
4423	3°	49.17	50.83
S10-1	4°	92.49	7.51
S2-1	5°	59.29	40.71
S2-2	6°	57.00	43.00
S2 ^{BAC}	7°	47.03	52.97
CDL69	8°	43.05	56.95
CECT 5873	9°	55.20	44.80
P12	10°	46.79	53.21
S1(R)	11°	32.75	67.25
R6	12°	34.12	65.88
CECT 935	13°	45.65	54.35
CECT 5366	14°	62.12	37.88
A7	15°	23.01	76.99
S1(S)	16°	61.71	38.29
CECT 911	17°	47.83	52.17

1°: Mayor productora de biofilm

17°: Menos productora de biofilm

4.4. Comparación de los métodos empleados para la cuantificación de las células presentes en los biofilms

En la Tabla 2 se puede observar que para los tres métodos empleados se obtuvo que la cepa menos productora de biofilms fue *L. monocytogenes* CECT 911, mientras que *L. monocytogenes* 4423 fue la mayor productora cuando ésta se cuantificó mediante el sistema TEMPO® y recuento en placa, aunque cuando se empleó la microscopía de epifluorescencia directa como método para la cuantificación de las células presentes en el biofilm, se obtuvo que *L. monocytogenes* CECT 5672 fue la que tuvo una mayor capacidad para formarlos. Con el uso de este último método, la cepa *L. monocytogenes* 4423 fue la tercera mayor productora de biofilms, por lo que en este aspecto no hay mucha diferencia en cuanto a la designación de la mayor y la menor productora de biofilm por los tres métodos. También se puede observar que la diferencia entre la cepa de mayor y menor producción de biofilms fue de aproximadamente una unidad logarítmica para los tres métodos (Tabla 2). Además, los resultados de los recuentos obtenidos para las otras cepas en cada uno de los métodos no se muestran tan distantes, teniendo cepas que no presentan diferencias significativas en sus recuentos ($P > 0.05$), por lo que podríamos agruparlas de acuerdo a la similitud respecto a su capacidad para formar biofilms, teniendo así cepas altamente productoras, medianamente productoras y poco productoras de biofilm.

Como se puede observar en la misma Tabla 2, el recuento por microscopía de epifluorescencia directa llega a ser aproximadamente una unidad logarítmica superior que los recuentos por sistema TEMPO® y recuento en placa. Esto concuerda con lo enunciado por Korkeala et al. (1988), quienes demostraron que el recuento por microscopía directa otorgaba resultados con una unidad logarítmica más alta que empleando el método de recuento en placa,

recordando que el sistema TEMPO[®] si bien es un método rápido y automatizado, se fundamenta en los métodos tradicionales de cultivo. Dichos autores también mencionan que al emplear una agitación fuerte con perlas de vidrio para poder desprender el biofilm, esto podría ser demasiado destructivo y por tanto producir daño celular. Este hecho podría ser en parte la razón del menor recuento obtenido por sistema TEMPO[®] y recuento en placa. No obstante, otro factor que se debería tener en consideración es el hecho de que una parte de las células adheridas a la superficie puede que no se hayan desprendido por estar demasiado adheridas e inmersas en la SPE, por lo que puede, en parte, subestimarse el recuento de células presentes en el biofilm.

Si bien el recuento en placa ha sido utilizado tradicionalmente en investigaciones en donde está presente la microbiología, cuando se trata de analizar el desarrollo del biofilm resulta ser un método poco confiable (Daims y Wagner, 2007), ya que solo se podrán observar las células viables cultivables, más no las células viables no cultivables y las muertas (Rose et al., 2003), las cuales sí que se pueden observar cuando la microscopía de epifluorescencia directa se emplea como método de cuantificación de las células presentes en el biofilm. Esta sería otra causa de los menores recuentos obtenidos por el sistema TEMPO[®] y recuento en placa respecto a la microscopía.

Mosquera-Fernández et al. (2014) y Fuster i Valls (2006) confirmaron en base a los resultados de sus investigaciones, que el empleo del análisis de imágenes obtenidas por microscopía para la cuantificación durante el desarrollo del biofilm resulta más ventajoso que el empleo de métodos tradicionales como el recuento en placa, al considerar las células viables, tanto las cultivables como las no cultivables, que también forman parte del biofilm. Breeuwer y Abee (2000) y Moore et al. (2001) también mencionaron esta razón como parte de los factores que pueden producir una

infraestimación del recuento microbiano cuando se emplea el método tradicional de recuento en placa.

Las Figuras 11 y 12 muestran una comparación entre los recuentos obtenidos por sistema TEMPO[®], recuento en placa y microscopía de epifluorescencia directa mediante regresión lineal, para las cepas CECT 5672, CECT 5873 y CECT 911 de mayor, mediana y menor producción de biofilms, respectivamente. La Figura 11 compara los recuentos obtenidos por microscopía de epifluorescencia directa y por sistema TEMPO[®] para las tres cepas antes mencionadas. Como se puede observar, para los tres casos el modelo lineal es adecuado para describir la relación que se establece entre éstas dos variables, ya que se tiene que los coeficientes de determinación (R^2) tienen valores de 0.974, 0.932 y 0.967 para las cepas CECT 5672, CECT 5873 y CECT 911, respectivamente. Este tipo de relación era de suponerse, ya que como se ha mencionado anteriormente los recuentos obtenidos por microscopía son alrededor de una unidad logarítmica mayor a los recuentos obtenidos por sistema TEMPO[®] (Tabla 2), lo que genera a su vez que haya una relación lineal entre ambas variables. La Figura 12 muestra la comparación de los resultados obtenidos por recuento en placa y por sistema TEMPO[®] mediante regresión lineal para las mismas cepas. Al igual que los casos anteriores, el modelo lineal se presenta como el más idóneo para describir la relación entre ambas variables, consiguiéndose coeficientes de determinación (R^2) con valores de 0.993, 0.909 y 0.984 para las cepas CECT 5672, CECT 5873 y CECT 911, respectivamente. Esta relación también era de esperarse, ya que los recuentos obtenidos por sistema TEMPO[®] y recuento en placa no presentan diferencias estadísticamente significativas para todas las cepas estudiadas ($P > 0.05$) (Tabla 2).

Resulta interesante recalcar que los recuentos obtenidos tanto por el sistema TEMPO[®] como por recuento en placa presentan valores bastante similares, lo cual evidenciaría la exactitud y fiabilidad del sistema TEMPO[®] como un método rápido y automatizado respecto al método de cultivo tradicional en placa. Además, ambos métodos generan una cuantificación indirecta de las células presentes en el biofilm, al necesitar un previo desprendimiento de las células adheridas a la superficie, pero que, como se ha argumentado anteriormente, no está totalmente garantizado que todas las células presentes sean desprendidas, a diferencia de la microscopía de epifluorescencia que genera una cuantificación directa, ya que el análisis se realiza in situ sobre la misma superficie (Holah et al., 1988), eliminando así la posibilidad de que haya células adheridas sin ser cuantificadas.

Todas estas desventajas del método tradicional son las ventajas de la microscopía de epifluorescencia directa, al no necesitar pasos intermedios (desprendimiento de las células y cultivo de las mismas) para evaluar la calidad microbiológica de la superficie, al considerar a las células viables no cultivables y a las no viables y muertas, que también forman parte del biofilm, y al generar resultados en menos de 30 minutos (Pontefract, 1991) y no en 48 horas como lo otorga el sistema TEMPO[®] y el recuento en placa, lo que permite poder tomar decisiones en tiempo real. Por ello es que la microscopía de epifluorescencia directa se perfila como el método más adecuado, rápido y confiable en cuanto a una mayor aproximación de la real contaminación microbiológica de las superficies de trabajo de acero inoxidable. Lo anterior concuerda con lo mencionado por Wirtanen et al. (1995), quienes demostraron que la microscopía de epifluorescencia directa es el método más confiable para evaluar el estado de higiene de la superficie que el cultivo tradicional en placa.

Como era de esperarse, la cantidad de biofilm formado varía entre las cepas de *L. monocytogenes* evaluadas por los tres métodos empleados. Desde finales del siglo pasado hasta nuestros días se está tratando de explicar las razones de estas variaciones, teniéndose resultados de la influencia de diversos factores, pero aún sigue siendo poco claro (Borucki et al., 2003; Harvey et al., 2007), motivo por el cual se sigue investigando.

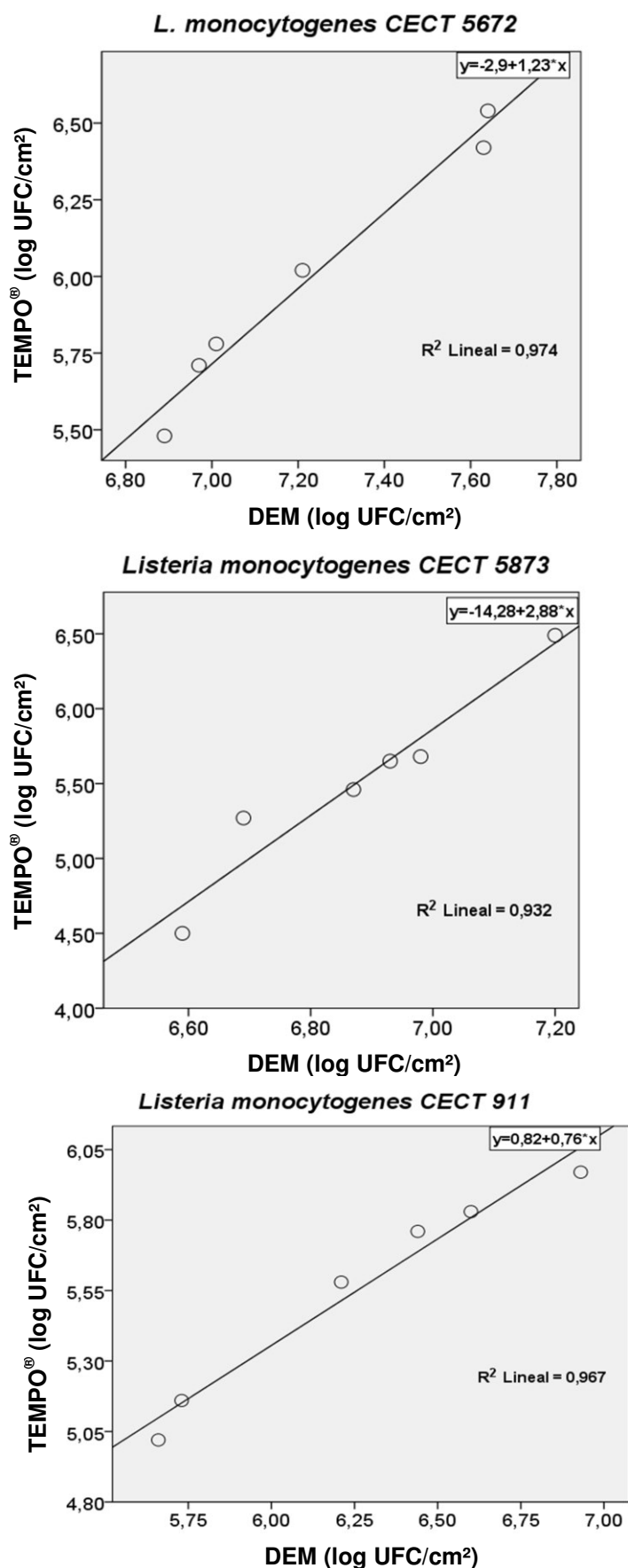


Figura 11. Comparación entre los recuentos obtenidos por microscopía de epifluorescencia directa (DEM) y por sistema TEMPO[®] para los biofilms formados por *L. monocytogenes* CECT 5672, CECT 5873 y CECT 911.

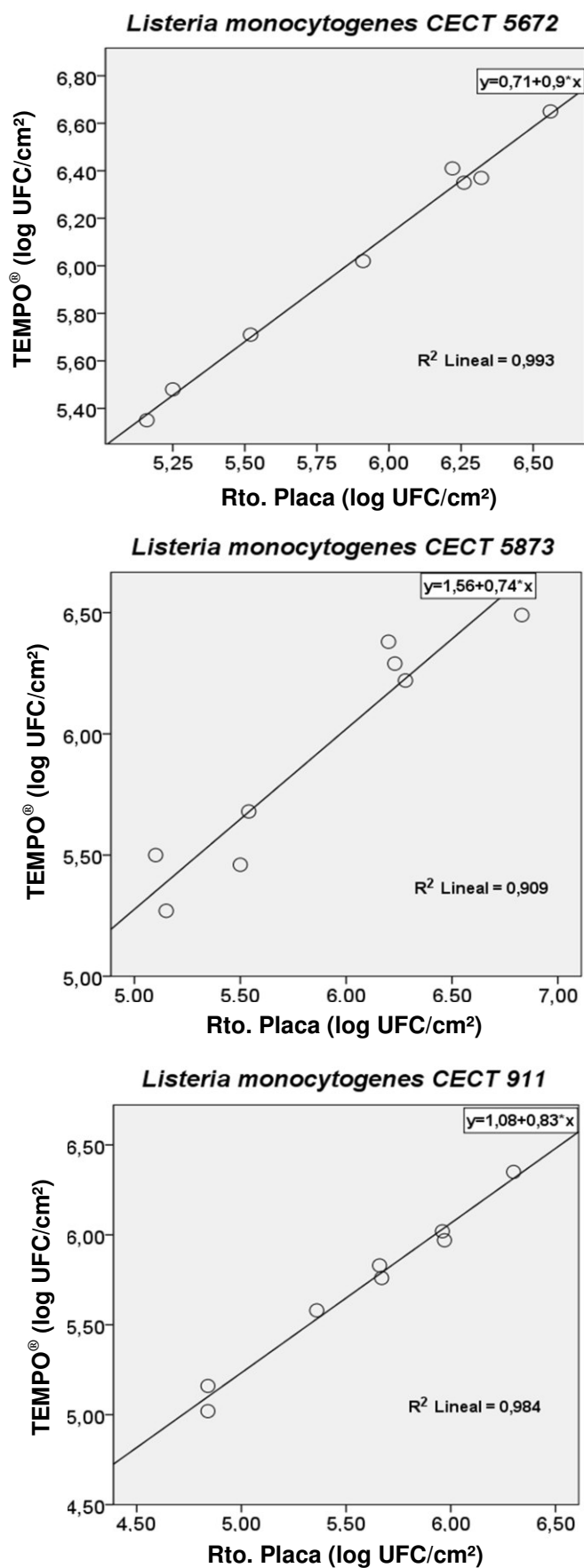


Figura 12. Comparación entre los recuentos obtenidos por sistema TEMPO® y recuento en placa para los biofilms formados por *L. monocytogenes* CECT 5672, CECT 5873 y CECT 911.

5. CONCLUSIONES

Todas las cepas de *L. monocytogenes* estudiadas fueron capaces de formar biofilm sobre una superficie de acero inoxidable bajo condiciones de 30°C durante 7 días de evaluación.

Los recuentos de las células presentes en los biofilms obtenidos por sistema TEMPO® (5.98×10^5 - 4.70×10^6 UFC/cm²) y recuento en placa (5.59×10^5 - 7.42×10^6 UFC/cm²) no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, el recuento obtenido por microscopía de epifluorescencia directa (2.98×10^6 - 2.17×10^7 UFC/cm²) sí presentó diferencias significativas sobre los recuentos obtenidos por los dos métodos antes mencionados, además de presentar recuentos superiores en alrededor de una unidad exponencial (logarítmica).

Las cepas *L. monocytogenes* CECT 5672 y 4423 presentaron el mayor número de células en el biofilm formado, siendo así las mayores productoras, mientras que la cepa *L. monocytogenes* CECT 911 fue la de menor producción de biofilm.

La microscopía de epifluorescencia directa demostró ser el método más eficaz para la cuantificación del número de células totales que forman el biofilm, el cual incluye a las viables cultivables y no cultivables y a las muertas, a diferencia del sistema TEMPO® y el recuento en placa que solo detectan a las viables cultivables.

6. RECOMENDACIONES

La desinfección de las superficies alimentarias deberá programarse en periodos menores a 7 días, y estar en un ambiente con baja humedad y temperatura menor a 30°C, con el objetivo de evitar generar un ambiente propicio para el crecimiento no solo de *L. monocytogenes* sino de todas las bacterias que tienen la capacidad para formar biofilm.

Ampliar el tiempo de evaluación para investigar la persistencia del biofilm en superficies alimentarias.

Continuar investigando el desarrollo de biofilms de *L. monocytogenes* sobre otros tipos de superficies presentes en el entorno de la producción alimentaria como vidrio, poliestireno, teflón, etc. Además, evaluar la eficacia de diferentes productos desinfectantes de diversos orígenes sobre los biofilm formados.

Implementar la microscopía de epifluorescencia directa como método de detección y cuantificación de la formación de biofilms sobre superficies alimentarias por parte de las instituciones que brindan servicios de análisis o por la misma empresa. Si bien su inversión es mayor, el envío de una producción contaminada por biofilms bacterianos al mercado resulta un costo superior que se puede evitar con el empleo de un método que detecte y cuantifique al biofilm de forma casi inmediata como lo hace la microscopía de epifluorescencia directa, lo que no se podría realizarse con un método tradicional.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aarnisalo, K., Lunden, J., Korkeala, H., Wirtanen, G. (2007). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *LWT - Food Sci. Technol.*, 40 (6), 1041-1048.
- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., Rorvik, L.M. (2000). Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 57–63.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N.E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.*, 196: 453–472.
- AENOR. (2002). Norma UNE-EN 13697:2002. <http://www.aenor.es/>.
- Agle, M.E. (2007). Biofilms in the food environment. *Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists*, 3-17.
- An, Y.H., Friedman, R.J. (2000). *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Humana Press Inc., Towata, New Jersey.
- Bagge-Ravn, D. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 239–250.
- Baker, J., Griffiths, M. y Collins–Thompson, D. (1992). Bacterial bioluminescence: applications in food microbiology. *Journal of Food Protection*, 55(1): 62–70.

- Bakker, H.C., Cummings, C.A., Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R.H., Degoricija, L., et al. (2010). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics.*, *11*, 688-708.
- Barnes, L.M., Lo, M.F., Adams, M.R., Chamberlain, A.H. (1999). Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*: 4543-8.
- Begley, M., Kerr, C., Hill, C. (2009). Exposure to bile influences biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Gut Pathogens*, *1*, 1-4.
- Berrón Jimenez, A. (2016). *Evaluación de la capacidad de formación de biofilms por parte de cepas salvajes de Listeria monocytogenes resistentes a amonio cuaternario. Análisis, cuantificación y detección.* (Tesis de máster). Universidad Autónoma de Barcelona.
- Bishop, P. (1997). Biofilm structure and kinetics, *Water Sci. Technol.*, *36*, 287-294.
- Blackman, I. y Frank, J. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of food protection*, *59*: 827–831.
- Bogino, P.C., Oliva, M., De las, M., Sorroche, F.G., Giordano, W. (2013). The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int. J. Mol. Sci.*, *14*, 15838-15859.
- Bonsaglia, E.C.R., Silva, N.C.C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J.P., Tsunemi, M.H., Rall, V.L.M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, *35*, 386–391.

- Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Loge, F., Call, D.R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol*, 69, 7336-7342.
- Bos R., Mei, H.C., Gold, J., Busscher, H.J. (2000). Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 189, 311-5.
- Boulos, L., Prévost M., Barbeau, B., Coallier J., Desjardins R. (1999). LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1), 77-86.
- Bredholt, B., Maukonen, J., Kujuanpaa, K., Alanko, T., Olofson, U., Husmark, U., Sjoberg. A. M., Wirtanen, G. (1999). Microbial methods for assessment of cleaning and disinfection of food-processing surfaces cleaned in low-pressure system. *European Food and Research Technology*. 209:145-152.
- Breeuwer, P. y Abee, T. (2000). Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 193-200.
- Bremer, P.J., S. Fillery, and A.J. Mcquillan. (2006). Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 254–262.
- Bryers, J.D. (2000). Biofilm formation and persistence. In: Bryers JD (ed) *Biofilms II: process analysis and applications*. Wiley-Liss Inc., New York, 45–88.
- Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting R.C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food control*, 75, 1-13.

- Campdepadrós, M., Stchigel, A.M., Romeu, M., Quilez, J., Solà, R. (2012). Effectiveness of two sanitation procedures for decreasing the microbial contamination levels (including *Listeria monocytogenes*) on food contact and non-food contact surfaces in a dessert processing factory. *Food Control*, 23, 26–31.
- Cappitelli, F., Polo, A., y Villa, F. (2014). Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. *Food Eng. Rev.*, 6, 29–42.
- Carpentier, B. y Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 499-511.
- Carpentier, B., y Cerf, O. (2011). Review - persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.*, 145, 1-8.
- Cartwright, E.J., Jackson, K.A., Johnson, S.D., Graves, L.M., Silk, B.J., Mahon, B.E. (2013). Listeriosis Outbreaks and Associated Food Vehicles, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(1), 1-9.
- Castro-Rosas, J. y Escartínb, E. (2005). Increased tolerance of *Vibrio cholerae* O1 to temperature, pH, or drying associated with colonization of shrimp carapaces. *Int. J. Food Microbiol.*, 102, 195-201.
- CDC, 2015a. Multistate outbreak of listeriosis linked to commercially produced, prepackaged caramel apples made from Bidart Bros. apples (Final Update). Accessed August 2015 <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html>.
- CDC, 2015b. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Blue Bell Creameries Products (Final Update). Accessed August 2015 <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/icecream-03-15/index.html>.

- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M., Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 728–737.
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.L., Brüßow, H. (2004). Phage-host interaction: an ecological perspective. *J. Bacteriol.*, 186, 3677-3686.
- Chmielewski, R.A.N., Frank, J.F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr.Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2 (1), 22-32.
- Cloete, T.E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 51, 277–282.
- Colin, R.T., Gopal, C.P. (1996). Applications of image analysis in cell technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 7, 35-45.
- Costerton, W.J. (2007). *Toward a unified biofilm theory*. 1st ed., vol. 1. Berlin, Germany: Springer.
- Daims, H., Wagner, M. (2007). Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75, 237–248
- Daved, H.M., O'Toole, G.A. (2000). Microbiological biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847-867.
- De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., et al. (1994). Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng.*, 43, 1131-8.

- De Jesús A.J., Whiting R.C. (2003). Thermal Inactivation, Growth, and Survival Studies of *Listeria monocytogenes* Strains Belonging to Three Distinct Genotypic Lineages. *Journal of Food Protection*, 66(9), 1611-1617.
- Den Bakker, H.C., Didelot, X., Fortes, E.D., Nightingale, K.K., Wiedmann, M. (2008). Lineage specific recombination rates and microevolution in *Listeria monocytogenes*. *B.M.C. Evol. Biol.*, 8, 277-90.
- Dewanti, R., y Wong, A.C. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2), 147-64.
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'Orio, V., Vergara, A., Conter, M., Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1552–1561.
- Dinu, L., Delaquis, P., Bach, S. (2009). Nonculturable response of animal enteropathogens in the agricultural environment and implications for food safety. *J. Food Prot.*, 72, 1342–1354.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L.A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2950–2958.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.
- Donlan, R., y Costerton, J. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 167–193.

Duguid, J.P., Anderson, E.S., y Campbell, I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 92(1), 107–38.

EFSA, 2013. EFSA reports on *Listeria* levels in certain ready-to-eat foods. <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130627>.

EFSA, 2015. *Campylobacter* and *Listeria* infections still rising in the EU-say EFSA and ECDC. <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130627>.

Fernández-Saiz, P., Soler, C., Lagaron, J., Ocio, M. (2010). Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in laboratory media and in fish soup. *Int. J. Food Microbiol.*, 137, 287-294.

Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., y Stasiewicz, M.J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, y implications for public health. *Journal of Food Protection*, 1, 150-170.

Flemming, H.C., y Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Review Microbiology*, 8, 623-632.

Folsom, J.P., Siragusa, G.R., Frank, J.F. (2006). Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 69 (4), 826-834.

Freitag, N.E., Port, G.C., Miner, M.D. (2009). *Listeria monocytogenes* e from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 623-628.

Friedman, M., Juneja, V. (2010). Review of antimicrobial and anti-oxidative activities of chitosans in food. *J. Food Prot.*, 73, 1737-1761.

- Fuster i Valls, N. (2006). *Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas*. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona.
- Gandhi, M., Chikindas, M.L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 1–15.
- Garrett, T., Bhakoo, M. y Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9, 10), 1049–1056.
- Gião, M.S., Keevil, C.W. (2014). *Listeria monocytogenes* can form biofilms in tap water and enter into the viable but non-cultivable state. *Microb. Ecol.*, 67, 603–611.
- Gomez, D., Azon, E., Marco, N., Carraminana, J.J., Rota, C., Arino, A., Yanguela, J. (2014). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiol.*, 42, 61–65.
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y.Y., Gymoese, P., Vogel, B.F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 8, 1165–1171.
- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., et al. (2010). *Listeria marthii* sp. nov. isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 1280–8.
- Grundling, A., Burrack, L., Bouwer, H., Higgins, D. (2004). *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through Mog R, a transcriptional repressor for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 12318–12323.

- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., Loessner, M.J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 93-100.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 228-233.
- Halberg Larsen, M., Dalmasso, M., Ingmer, H., Langsrud, S., Malakauskas, M., Mader, A., Møretro, T., Smole Možina, S., Rychli, K., Wagner, M., Wallace, R.J., Zenteke, J., Jordan, K. (2014). Persistence of foodborne pathogens and their control in primary and secondary food production chains. *Food Control*, 44, 92–109.
- Harvey, J., Keenan, K.P., Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24, 380-392.
- Hassan, A.N., Birt, D.M., y Frank, J.F. (2004). Behavior of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* biofilm on a condensate-forming surface. *Journal of Food Protection*, 67, 322-327.
- Herald, P.J., y Zottola, E.A. (1988). Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel Surfaces at Various Temperatures and pH Values. *Journal of Food Science*, 53(5), 1549–1562.
- Herman, B. (1998). *Fluorescence microscopy*. Springer-Verlag, New York.
- Hernández Puga, C. (2016). *Simulación y control de biofilms portadores de "Listeria monocytogenes" en la industria alimentaria*. (Tesis de doctorado). Universidad Complutense de Madrid.

- Heubner, E.W. (2009). Stainless steel - when health comes first. *Environ. Human Health Ser.*, 2, 1-36.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35, 322-332.
- Holah, J.T., Betts, R.P. y Thorpe, R.H. (1988). The use of direct epifluorescence microscopy (DEM) and the direct epifluorescence filter technique (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces. *Journal of Applied and Bacteriology*, 65, 215-221.
- Holch, A., Webb, K., Lukjancenko, O., Ussery, D., Rosenthal, B.M., Gram, L. (2013). Genome sequencing identifies two nearly unchanged strains of persistent *Listeria monocytogenes* isolated at two different fish processing plants sampled 6 years apart. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 2944-2951.
- Hong, Y., Choi, S.T., Lee, B.H. y Conway, W.S. (2015). Combining of bacteriophage and G. asaii application to reduce *L. monocytogenes* on honeydew melon pieces. *Food Technology*, 3, 115-22.
- Hyde, J., Darouiche, R. y Costerton, J. (1998). Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article. *The Journal of Heart Valve Disease*, 7: 316-326.
- Ibusquiza, P.S., Herrera, J.J.R., Cabo, M.L. (2011). Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.*, 28, 418-425.
- Iversen, C., Lane, M., y Forsythe, S.J. (2004). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 378-82.

- Kalmokoff, M., Austin, J., Wan, X., Sanders, G., Banerjee, S., Farber, G. (2001). Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 725–734.
- Kaplan, J.B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., Fine, D.H. (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous b-hexosaminidase activity. *J. Bacteriol.*, 185 (16), 4693-4698.
- Knabel, S.J., Reimer, A., Verghese, B., Lok, M., Ziegler, J., Farber, J., Pagotto, F., Graham, M., Nadon, C.A., the8 Canadian Public Health Laboratory Network (CPHLN), Gilmour, M.W. (2012). Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988 to 2010. *J. Clin. Microbiol.*, 50, 1748–1751.
- Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khopade, A.N., Mahadik, K.R. (2008). Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 8: 159-168.
- Korkeala, H., Suortti, T., Makela, P. (1988). Ropy slime formation in vacuum-packed cooked meat products caused by homofermentative lactobacilli and a *Leuconostoc* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 7, 339.
- Kumar, C.G., y Anand, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1-2), 9-27.
- Kumar, S., Parvathi, A., George, J., Krohne, G., Karunasagar, I., y Karunasagar, I. (2009). A study on the effects of some laboratory-derived genetic mutations on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 527-531.

- Kusumaningrum, H., Riboldi, G., Hazeleger, W. y Beumer, R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 227–236.
- Kuusela, P., Moran, A.P., Vartio, T., y Kosunen, T.U. (1989). Interaction of *Campylobacter jejuni* with extracellular matrix components. *Biochimica et Biophysica Acta*, 993(2-3), 297–300.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Penades, J.R., et al. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Mol. Microbiol.*, 58, 1322-1339.
- Latorre, A.A., Van Kessel, J.S., Karns, J.S., Zurakowski, M.J., Pradhan, A.K., Boor, K.J., et al. (2010). Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 93, 2792-2802.
- Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J.M., Martín, C., Silva, A. (2004). Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J. Clin. Periodontol.*, 31, 1061–1069.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C.H., Grimont, P., Le-Fléche- Matéos, A., Roche, S., et al. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 60, 2210-4
- Lemon, K.P., Higgins, D.E., y Kolter, R. (2007). Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189(12), 4418-4424.

- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55(6), 645-659.
- Liu, Y. J., Xie, J., Zhao, L. J., Qian, Y. F., Zhao, Y., y Liu, X. (2015). Biofilm formation characteristics of *Pseudomonas lundensis* isolated from meat. *Journal of Food Science*, 80, 2904-2910.
- Lourenço, A., Machado, H., Brito, L. (2011). Biofilms of *Listeria monocytogenes* produced at 12 °C either in pure culture or in co-culture with *Pseudomonas aeruginosa* showed reduced susceptibility to sanitizers. *J. Food Sci.* 76, 142–148.
- Lourenço, A., Neves, E., y Brito, L. (2009). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from traditional cheese-dairies to in-use sanitizers. *Food Control*, 20, 585-589.
- Lunden, J., Miettinen, M., Autio, T., Korkeala, H. (2000). Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *J. Food Prot.*, 63, 1204–1207.
- Magalhães, R., Ferreira, V., Brandão, T.R.S., Casquete Palencia, R., Teixeira, P. (2016). Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: a focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. *Food Microbiol.*, 57, 103–108.
- Mammina, C., Aleo, A., Romani, C., Pellissier,, N., Nicoletti, P., Pecile, P., et al. (2009). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human listeriosis cases in Italy. *J. Clin. Microbiol.*, 47: 2925-30.

- Martins, E.A., y Germano, P.M.L. (2011). *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of Sao Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. *Food Control*, 22, 297–302.
- Mattila, T., Manninen, A. y Kylasiurola, A.L. (1990). Effect of cleaning-in-place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line. *Journal of Dairy Research*, 57: 33-39.
- Mauder, M., Williams, T., Fritsch, F., Kuhn, M., Beier, D. (2008). Response regulator DegU of *Listeria monocytogenes* controls temperature-responsive flagellar gene expression in its unphosphorylated state. *J. Bacteriol.*, 13, 4777–4781.
- Maukonen, J., Mattila-Sandholm, T. y Wirtanen, G. (2000). Metabolic Indicators for assessing bacterial viability in hygiene sampling using cells in suspension and swabbed biofilm. *Food Science and Technology*. 33, 225-233.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T. y Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 327–356.
- Mazza, R., Mazzette, R., McAuliffe, O., Jordan, K., Fox, E.M. (2015). Differential gene expression of three gene targets among persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* strains in the presence or absence of benzethonium chloride. *J. Food Prot.*, 78, 1569–1573.
- McGann, P., Ivanek, R., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2007). Temperature-dependent expression of *Listeria monocytogenes* internalin and internalin-like genes suggests functional diversity of these proteins among the listeriae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 2806–2814.

- Meyer, B. (2003). Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 51, 249–253.
- Miettinen, M.K., Bjorkroth, K.J., Korkeala, H.J. (1999). Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 187–192.
- Min, S.C., Schraft, H., Hansen, L.T., Mackereth, R. (2006). Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiol.*, 23, 250–259.
- Moens, S., y Vanderleyden, J. (1996). Functions of bacterial flagella. *Critical Reviews in Microbiology*, 22(2), 67-100.
- Molecular Probes Live/Dead BacLight™ bacteria viability kit technical sheet. Molecular Probes Inc., 1995.
- Moore, G., Griffith, C. y Fielding, L.M. (2001). A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: a laboratory study. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 21, 478-488.
- Moretro, T., Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1, 107-121.
- Mosquera-Fernández, M., Rodríguez-López, P., Cabo, M.L., Balsa-Canto, E. (2014). Numerical spatio-temporal characterization of *Listeria monocytogenes* biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 182-183, 26-36.
- Muller, J., Miller, M.C., Nielsen, A.T., Schoolnik, G.K., Spormann, A.M. (2007). vpsA- and luxO-independent biofilms of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 275, 199-206.

- Nilsson, R.E., Ross, T., Bowman, J.P. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150, 14–24.
- Norwood, D.E., y Gilmour, A. (1999). Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 576-582.
- Norwood, D.E., y Gilmour, A. (2000). The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 512-520.
- O'Connor, L., O'Leary, M., Leonard, N., Godinho, M., O'Reilly, C., Coffey, L., Egan, J., O'Mahony, R. (2010). The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment. *Lett. Appl. Microbiol.*, 51, 490–498.
- Oliveira, M.M.M.d., Brugnera, D.F., Cardoso, M.d.G., Alves, E., Piccoli, R.H. (2010). Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, 21, 549-553.
- Oliveira, M.M.M.d., Brugnera, D.F., Nascimento, J.A.d., Batista, N.N., Piccoli, R.H. (2012). Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. *Eur. Food Res. Technol.*, 234, 821-832.
- Ortiz, S., López, V., Villatoro, D., López, P., Dávila, J.C., Martínez-Suárez, J.N.V., (2010). A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 1177-1184.

- Pan, Y., Breidt Jr., F., Gorski, L. (2010). Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 1433-1441.
- Pan, Y., Breidt, F., Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 7711–7717.
- Pan, Y., Breidt, F.Jr., Kathariou, S. (2009). Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed culture biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 5846-52.
- Parsek, M.R., Singh, P.K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57, 677-701.
- Peel, M., Donachie, W., y Shaw, A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *Journal of General Microbiology*, 134(8), 2171-2178.
- Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., Lo Nostro, A. (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control* 21, 703–713.
- Pilchová, T., Hernould M., Prévost H., Demnerová K., Pazlarová J., y Tresse O. (2014). Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 35, 366-372.
- Ploux, L., Ponche, A., Anselme, K. (2010). Bacteria/material interfaces: role of the material and cell wall properties. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 24, 2165-2201.

- Poimenidou, S.V., Chrysadaku, M., Tzakoniati, A., Bikouli, V.C., Nychas, J.J., Skandamis, P.N. (2016). Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 164–171.
- Pontefract, R.D. (1991). Bacterial adherence: Its consequences in food processing. *Canadian Institute of Food Science and Technology*, 64 (3/4), 113-117.
- Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Ehrlich, G.D. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 12, 185-90.
- Puga, C. H., SanJose, C., y Orgaz B. (2016). Biofilm development at low temperatures enhances *Listeria monocytogenes* resistance to chitosan. *Food Control*, 65, 143-151.
- Ramadan, H. H. (2006). Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 14, 183-186.
- Renier, S., Hébraud, M., Desvaux, M. (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environmental Microbiology*, 13(4), 835-850.
- Ríos Castillo, A.G. (2013). *Evaluación del nivel de contaminación de superficies y la eficacia de productos desinfectantes a corto y largo plazo. Nuevos métodos.* (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona.
- Rieu, A., Lemaître, J., Guzzo, J., Piveteau, P. (2008). Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 126, 76–82.

- Roller, S., Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 67-77.
- Ronner, A.B., Wong, A.C.L. (1993). Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n-rubber. *J. Food Prot.*, 56, 750–758.
- Rose, L.J., Donlan, R., Banerjee, S.N., Arduino, M.J. (2003). Survival of *Yersinia pestis* on Environmental Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2166-2171.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, F.R., Kim, H.S., Do Ha, S. (2016). Effectiveness of a phage cocktail as a biocontrol agent against *L. monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 78, 256–263.
- Sanclement, J. A., Webster, P., Thomas, J., y Ramadan, H. H. (2005). Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis, *Laryngoscope* 115, 578-582.
- Sandasi, M., Leonard, C.M., Viljoen, A.M. (2010). The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 50, 30-35.
- Sanderson, A.R., Leid, J.G., Hunsaker, D. (2006). Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 116: 1121-6.
- Sharma, M., Anand, S. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry e a case. *Food Control*, 13(6-7), 469–477.
- Shi, X., Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology* 20, 407-413.

- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 573–583.
- Slama, B.R., Bekir, K., Miladi, H., Noumi, A., Bakhrouf, A. (2012). Adhesive ability and biofilm metabolic activity of *Listeria monocytogenes* strains before and after cold stress. *Afr. J. Biotechnol.*, 11, 12475–12482.
- Sofos, J. N., y Geornaras, I. (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms and control of *Escherichia coli* O157:H7 in non-intact and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86, 2–14.
- Somers, E.B., y Wong, A.C.L. (2004). Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *Journal of Food Protection*, 67, 2218-2229.
- Soni, K.A., Nannapaneni, R. (2010). Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *J. Food Prot.*, 73, 1519-1524.
- Srey, S., Jahid, I. K., y Ha, S. Do. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572–585.
- Stasiewicz, M.J., Oliver, H.F., Wiedmann, M., den Bakker, H.C. (2015). Whole-genome sequencing allows for improved identification of persistent *Listeria monocytogenes* in food-associated environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6024–6037.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Svabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtitre-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Meth.*, 40, 175–179.

- Stewart, P.S., Franklin, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(3), 199-210.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S., Klapper, I. (2002a). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 29 (6), 361-367.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002b). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 187-209.
- Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9.
- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), 1236-1243.
- Takahashi, H., Suda, T., Tanaka, Y., Kimura, B. (2010). Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 618-625.
- Takeuchi, K. y Frank, J.F. (2001). Confocal microscopy and microbial viability detection for food research. *Journal of Food Protection*, 64(12): 2088–2102.
- Takhistov, P., y George, B. (2004). Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(4), 259-270.
- Tawakoli, P.N., Al-Ahmad, A., Hoth-Hanning, W., Hanning, M., Hanning, C. (2013). Comparison of different live/dead staining for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin.Oral Investig.*, 17, 841–850.

- Taylor, R., Maryan, C., y Verran, J. (1998). Retention of oral microorganisms on cobalt chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 80(5), 592–597.
- Todhanakasem, T., y Young, G. M. (2008). Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *Journal of Bacteriology*, 190, 6030-6034.
- Tresse, O., Lebret, V., Garmyn, D., Dussurget, O. (2009). The impact of growth history and flagellation on the adhesion of various *Listeria monocytogenes* strains to polystyrene. *Can. J. Microbiol.*, 55, 189–196.
- Tresse, O., Shannon, K., Pinon, A., Malle, P., Vialette, M., y Midelet-Bourdin, G. (2007). Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food processing facilities and clinical cases to inert surfaces. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1569-1578.
- Tsai, G.J., Su, W.H., Chen, H.C., Pan, C.L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fish. Sci.*, 68, 170-177.
- Valderrama, W.B., Cutter, C.N. (2013). An ecological perspective of *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 53, 801-817.
- Vásquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., et al. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev.*, 14, 584-640.
- Velge, P., Roche, S.M. (2010). Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: A result of the evolution between saprophytism and virulence? *Rev Fut Microbiol.*, 5, 1799-821.

- Verma, S.C., Miyashiro, T. (2013). Quorum sensing in the Squid-Vibrio symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 16386-16401.
- Vives-Rego, J. Lebaron, P. Nebe-von Caron, G. (2010). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 429-488.
- Vongkamjan, K., Roof, S., Stasiewicz, M.J., Wiedmann, M. (2013). Persistent *Listeria monocytogenes* subtypes isolated from a smoked fish processing facility included both phage susceptible and resistant isolates. *Food Microbiol.*, 35, 38–48.
- Waak, E., Tham, W., Danielsson-Tham, M.L. (2002). Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (7), 3366-3370.
- Wakimoto, N., Nishi, J., Sheikh, J., Nataro, J.P., Sarantuya, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M., Kawano, Y. (2004). Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for entero aggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71, 687–690.
- Wang, J., Ray, A.J., Hammons, S.R., Oliver, H.F. (2015). Persistent and transient *Listeria monocytogenes* strains from retail deli environments vary in their ability to adhere and form biofilms and rarely have *inlA* premature stop codons. *Foodborne Pathog. Dis.*, 12, 151–158.
- Ward, T.J., Ducey, T.F., Usgaard, T., Dunn, K.A., Bielawski, J.P. (2008). Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 7629-42.
- Watnick, P., y Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2675-2679.

- Whitehead, K.A., Benson, P., Smith, L.A., Verran, J. (2009). The use of physicochemical methods to detect organic food soils on stainless steel surfaces. *Biofouling. The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 25, 749-756.
- Whitehead, K.A., Verran, J. (2015). Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Curr. Opin. Food Sci.*, 2, 84-91.
- Wilks, S.A., Michels, H.T., Keevil, C.W. (2006). Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. *Int. J. Food Microbiol.*, 111, 93–98.
- Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U. (2000). Heterogeneity in biofilms. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 24, 661-71.
- Wimpenny, J., Wilkinson, T., Peters, A. (1995). Monitoring microbial colony growth using Image analysis techniques. *Binary*, 7, 14-18.
- Wirtanen, G., Alanko, T., Mattila-Sandholm, T. (1995). Evaluation of epifluorescence image analysis of biofilm growth on stainless steel surfaces, *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, 5, 319-326.
- Wulff, G., Gram, L., Ahrens, P., Fonnesbech Vogel, B. (2006). One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter- and smokehouses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 4313–4322.
- Yang, Y., Miks-Krajnik, M., Zheng, Q., Lee, S.B., Lee, S.C., y Yuk, H.G. (2016). Biofilm formation of *Salmonella enteritidis* under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. *Food Microbiology*, 54, 98-105.
- Zhang, C., Zhang, M., Ju, J., Nietfeldt, J., Wise, J., Terry, P.M., Olson, M., Kachman, S.D., Wiedmann, M., Samadpour, M., Benson, A.K. (2003). Genome diversification in

- phylogenetic lineages I and II of *Listeria monocytogenes*: Identification of segments unique to lineage II populations. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5573–5584.
- Zang, T., y Fang, H.H.P. (2001). Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Biotechnol. Lett.*, 23, 405–409.
- Zhang, T. y Bishop, P. (1994). Structure, activity and composition of biofilm, *Water Sci. Technol.*, 29, 335-344.
- Zhao, T., Podtburg, T. C., Zhao, P., Chen, D., Baker, D. A., Cords, B., et al. (2013). Reduction by competitive bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and *Listeria* bacteria in floor drains in a ready-to-eat poultry processing plant. *Journal of Food Protection*, 76, 601-607.

8. ANEXOS

ANEXO A. Composición de medios preparados

Medio	Componente
sTSYEB	
TSB	30 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	10 g
Cloruro de sodio	20 g
Agua destilada	1000 ml
TSS	
Triptona	1 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 ml
Ph	7.0 ± 0.2
Neutralizante	
Triptona	1 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Tween [®] 80	30 g
Agua destilada	1000 ml
Ph	7.0 ± 0.2

Fuente: Pan et al., 2009

ANEXO B.
Costos por servicio de análisis de superficies alimentarias mediante diferentes métodos

Método	Sistema TEMPO®	Recuento en placa	Microscopía de epifluorescencia directa
Costo (€/muestra)	18,00	20,50	25,00

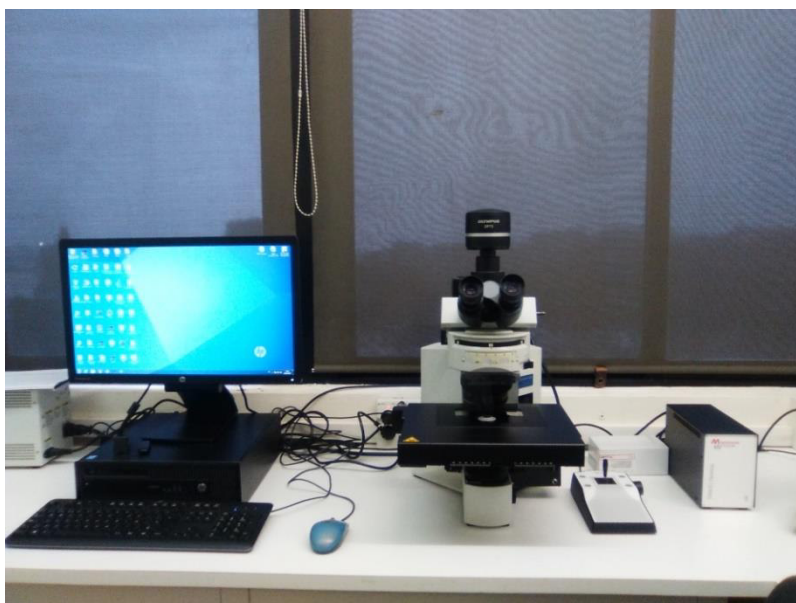
Fuente: Servicio de Análisis y Aplicaciones Microbiológicas – Universidad Autónoma de Barcelona

ANEXO C.
Ventajas y desventajas de los metodos empleados

Método	Ventajas	Desventajas
Sistema TEMPO®	<ul style="list-style-type: none"> • Automatizado • Procesa hasta 500 test por día • Ahorro de costos por materiales • Trazabilidad total • Sencillez • No necesita personal muy especializado 	<ul style="list-style-type: none"> • Su análisis estadístico se basa en el método tradicional • Otorga resultados en 48 horas • Realiza un análisis indirecto • No muestra a las células viables no cultivables y a las muestras
Recuento en placa	<ul style="list-style-type: none"> • Bajos costos de material • Muestra el crecimiento progresivo de las células • No necesita personal muy especializado 	<ul style="list-style-type: none"> • Se necesita una mayor cantidad de personal para el análisis • Vulnerable al error humano • Poca sensibilidad • Otorga resultados en 48 horas • Realiza un análisis indirecto • No muestra a las células viables no cultivables y a las muestras
Microscopía de epifluorescencia directa	<ul style="list-style-type: none"> • Otorga resultados en 30 minutos • Alta sensibilidad • Menos vulnerable al error humano • Realiza un análisis directo • Muestra a las células viables cultivables y no cultivables y a las muertas 	<ul style="list-style-type: none"> • Costo de análisis alto • Necesita personal especializado

Fuente: Berrón (2016); Datos del Sistema TEMPO® obtenido: <http://www.biomerieux.es/microbiologia-industrial/tempor>

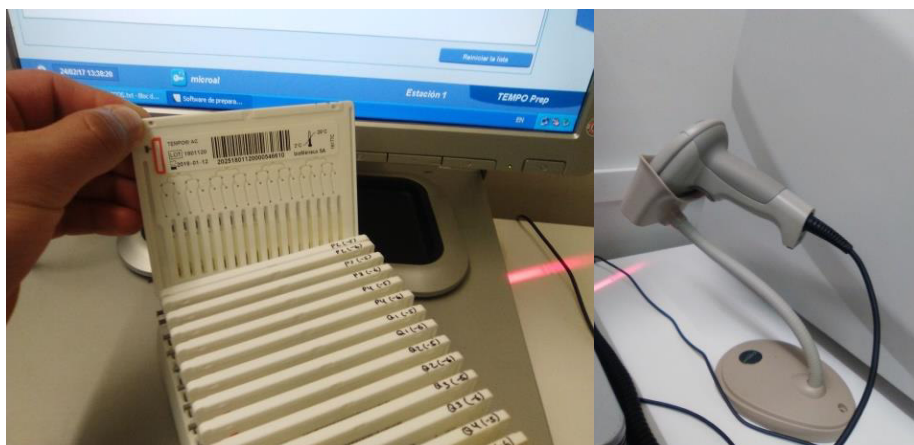
ANEXO D.
Microscopio de epifluorescencia directa (DEM)



ANEXO E.
Estación de TEMPO® filler



ANEXO F.
Estación de TEMPO® prep



ANEXO G.
Estación de TEMPO® reader



ANEXO H.
Ejemplo de muestra de resultados por el sistema TEMPO®

Software de Lectura - TEMPO

Filtrar por Tests y Muestras
con tests con o sin resultado(s) / resultados producidos entre vie 24/02/2017 10:03 AM y vie 24/02/2017 01:03 PM
/ validado o no

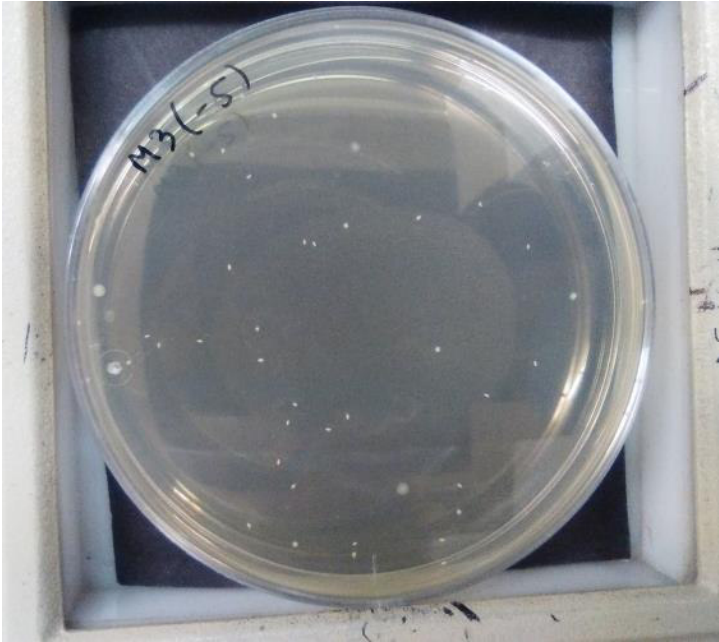
Vista tabla Vista esquema

	Muestra	Test	Modo	Preparado el	Por	Resultado		Estad.	Anotacio...	Valida...
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_M1(-5)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		= 18 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_M1(-6)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		< 1,0 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_M2(-5)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		= 12 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_M2(-6)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		< 1,0 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_M3(-5)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		= 36 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_M3(-6)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		= 5,5 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_M4(-5)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		= 11 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_M4(-6)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		< 1,0 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_N1(-5)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		= 83 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_N1(-6)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		= 7,3 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_N2(-5)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		= 73 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_N2(-6)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		= 7,1 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_N3(-5)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		= 21 UFC/g				✓
<input type="checkbox"/>	22-02-17_discos_N3(-6)	004	40-48h mié 22/02/2017 02...	microal		< 1,0 UFC/g				✓

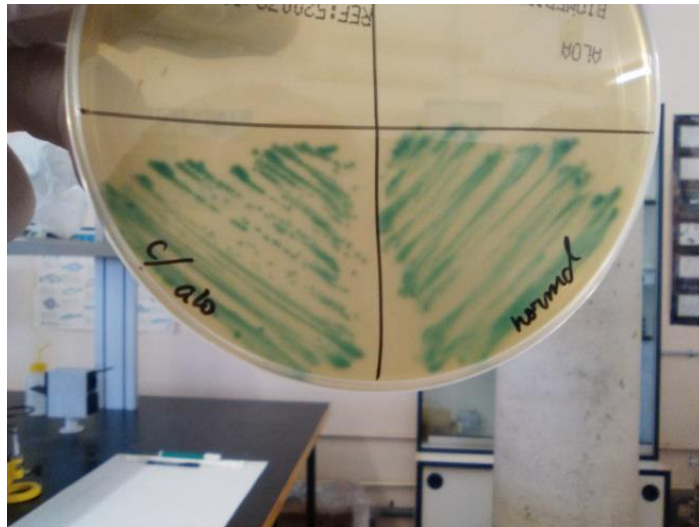
0 elemento(s) seleccionado(s) de 24 Carga completa

Seleccionar todo Anular selección

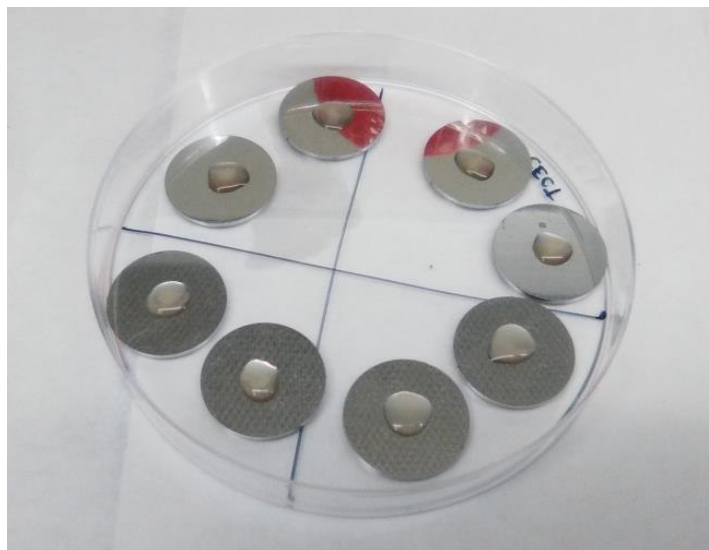
ANEXO I.
UFC de *Listeria monocytogenes* en medio agar TSA



ANEXO J.
Resultado positivo para *Listeria* en medio selectivo
cromogénico ALOA



ANEXO K.
Inoculación de *L. monocytogenes* en suspensión sobre
discos de acero inoxidable para el inicio de la
formación de biofilm



ANEXO L.**Metodología aplicada para la formación y cuantificación de los biofilms**